

**EMBRIOGENESIS SOMATIK DAN PENGINOKULATAN
IN VITRO TEBU (*Saccharum officinarum*)
DENGAN KULAT**

oleh

AFIZAH AYOB

**Tesis diserahkan untuk memenuhi
sebahagian keperluan bagi
Ijazah Sarjana Sains**

Julai 1997

MARKS
5247

KANDUNGAN

MUKASURAT

PENGHARGAAN	xii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
1.0 PENGENALAN	
1.1 Tanaman tebu	1
1.2 Kultur tisu tebu	2
1.3 Penyakit tebu	5
1.4 Penginokulatan <i>in vitro</i>	6
1.5 <i>Fusarium moniliforme</i>	7
1.6 Objektif projek	8
2.0 TINJAUAN BACAAN	
2.1 Kultur tisu tebu	9
2.1.1 Pemilihan eksplan	9
2.1.2 Pembentukan kalus	10
2.1.3 Jenis-jenis kalus	13
2.1.4 Pembentukan kalus embriogenik	13
2.1.5 Embriogenesis somatik	14
2.1.6 Variasi somaklon dan pertumbuhan semula	15
2.2 Penyakit tebu	18
2.3 Penyaringan penyakit	20
2.4 Penginokulatan <i>in vitro</i>	22

3.0 KAEDAH

3.1	Penghasilan plantlet kultur tisu tebu	26
3.1.1	Pemilihan bahagian tebu sebagai eksplan	26
3.1.2	Pensterilan eksplan	27
3.1.3	Pengkulturan eksplan bagi pembentukan kalus tebu	28
3.1.4	Pengaruh embriogenesis dari kalus	29
3.2	Pensterilan peralatan	30
3.3	Kaedah penginokulatan	30
3.3.1	Penyediaan kultur stok <i>Fusarium moniliforme</i>	30
3.3.2	Penyediaan ampaian konidia <i>F.moniliforme</i>	30
3.3.3	Penginokulatan <i>F.moniliforme</i> ke atas kalus tebu	31
3.3.4	Penginokulatan <i>F.moniliforme</i> ke atas plantlet tebu	31

4.0 KEPUTUSAN

4.1	Pembentukan plantlet kultur tisu tebu	33
4.1.1	Penghasilan kalus	33
4.1.1.1	Penghasilan kalus daripada eksplan daun muda	33
4.1.1.2	Penghasilan kalus daripada eksplan meristem apeks	39
4.1.1.3	Penghasilan kalus daripada eksplan meristem sub-apeks	41

4.1.2	Proses percambahan embrio somatik	49
4.1.2.1	Pengaruh pucuk	55
4.1.2.2	Pengaruh akar	59
4.1.3	Variasi somaklon	62
4.2	Penginokulatan <i>in vitro</i> plantlet tebu dengan ampai konidia <i>Fusarium moniliforme</i>	65
4.2.1	Pemerhatian terhadap pembentukan awal hifa	65
4.2.1.1	Penginokulatan plantlet	65
4.2.1.2	Penginokulatan kalus	68
4.2.2	Penjangkitan hifa ke dalam tisu perumah	69
4.2.2.1	Melalui stomata	69
4.2.2.2	Melalui laluan alternatif	73

5.0 PERBINCANGAN

5.1	Kultur tisu tebu	77
5.1.1	Proses penghasilan kalus	77
5.1.1.1	Eksplan	77
5.1.1.2	Pembentukan kalus	78
5.1.1.3	Jenis-jenis kalus	80
5.1.1.4	Pembentukan kalus embriogenik	81
5.1.2	Embriogenesis somatik	83
5.1.3	Variasi somaklon	86

5.2	Penginokulatan <i>in vitro</i> plantlet kultur tisu tebu dengan ampaian konidia <i>Fusarium moniliforme</i>	87
5.2.1	Fasa pra-jangkitan	88
	Percambahan konidia	88
5.2.2	Fasa jangkitan	90
	5.2.2.1 Jangkitan melalui stomata	91
	Mekanisme jangkitan melalui stomata	92
	5.2.2.2 Jangkitan secara terus	93
	Mekanisme jangkitan secara terus	94
	5.2.2.3 Jangkitan melalui rekahan dan luka	96
	Mekanisme jangkitan melalui rekahan/luka	96
5.2.3	Fasa selepas jangkitan	97
6.0	KESIMPULAN	
6.1	Penghasilan plantlet kultur tisu tebu	99
6.2	Penginokulatan <i>in vitro</i> plantlet tebu dengan <i>Fusarium moniliforme</i>	101
7.0	CADANGAN	103
8.0	BIBLIOGRAFI	104

LAMPIRAN

- Lampiran A-1 : Penyediaan Medium Murashige & Skoog's (MS)
- Lampiran A-2 : Langkah-langkah penyediaan sampel bagi kajian histologi
- Lampiran A-3 : Penyediaan tisu untuk Mikroskop Penskanan Elektron (SEM)
- Lampiran B : Kesan kehadiran 2,4-D ke atas pembentukan kalus
ANOVA : Faktor tunggal dengan replikasi
- Lampiran C : Kesan kehadiran 2.5 g/l arang teraktif ke atas pembentukan kalus
ANOVA : Faktor tunggal dengan replikasi
- Lampiran D1-D5 : Abstrak-abstrak kertas kerja yang telah dihasilkan

SENARAI JADUAL

MUKASURAT

Jadual 1.1	Penggunaan tanah bagi penanaman tebu di Malaysia (1985)	1
Jadual 1.2	Bekalan gula ASEAN 1984/85 ('000 tan)	2
Jadual 2.1	Spesies tanaman yang mengalami variasi somaklon	17
Jadual 4.1	Berat kering kalus tebu (g) pada medium agar-agar MS + 2.5 g/l arang teraktif dengan kehadiran 3 kepekatan 2,4-D yang berbeza	44
Jadual 4.2	Perbandingan berat kering kalus (g) yang terhasil oleh eksplan-eksplan yang dikultur di atas medium MS dengan dan tanpa kehadiran arang teraktif (2.5 g/l)	48
Jadual 4.3	Peratusan variasi yang diperhatikan pada plantlet tebu	62

SENARAI RAJAH

Rajah 1.1	Struktur daun tebu	3
Rajah 2.1	Taburan kawasan jangkitan tebu yang disebabkan oleh fungus	19

SENARAI GAMBAR

Gambar 1	: Peringkat awal pembentukan kalus pada eksplan daun muda tebu (4 hari selepas pengkulturan). Pembentukan kalus diperhatikan bermula pada bahagian tulang daun. M = tulang daun; K = kalus	34
Gambar 2	: Pembentukan sel kalus pada lapisan epidermis daun (6 hari selepas pengkulturan). Pembentukan kalus lebih ketara pada bahagian abaksial daun. K = kalus; V = sistem vaskular; E = lapisan epidermis	34
Gambar 3	: Pemerhatian bahagian tulang daun (6 hari selepas pengkulturan). K = kalus; EB = epidermis bawah; EA = epidermis atas; V = sistem vaskular	35
Gambar 4	: Eksplan daun muda yang diperolehi daripada kawasan berhampiran dengan apeks menunjukkan kejadian pemerangan dan pembentukan kalus putih dalam kuantiti yang kecil. K = kalus; D = eksplan	36

Gambar 5	:	Pembentukan kalus padat yang keras, berwarna keputihan dan mudah dileraikan pada eksplan daun muda (20 hari selepas pengkulturan). Pembentukan diperhatikan bermula pada bahagian permukaan yang bersentuhan dengan medium. K = kalus; D = eksplan	37
Gambar 6	:	Kalus putih yang terbentuk di atas kalus padat seandainya tempoh pengkulturan dipanjangkan (35 hari selepas pengkulturan). Keadaan kalus adalah lebih putih dan keras. K = kalus	37
Mikrograf 7	:	Struktur kalus padat yang berbentuk globular yang berada dalam kumpulan bagi membentuk tisu kalus yang keras dan bersifat embriogenik. G = sel kalus yang berbentuk globular	38
Gambar 8	:	Eksplan daun muda yang berbentuk seperti bunga akibat daripada pengembangan yang tidak sekata antara lapisan-lapisan daun (6 hari selepas pengkulturan). L = lapisan daun yang mengembang; M = tulang daun	39
Gambar 9	:	Kalus bermusilaj yang tidak embriogenik, terhasil pada bahagian eksplan meristem apeks yang bersentuhan dengan medium. Kalus ini mempunyai sifat merekit yang menyebabkan ia sukar untuk disubkultur. K = kalus	40
Mikrograf 10	:	Struktur kalus bermusilaj yang panjang dan terletak berjauhan antara satu sama lain. Sel-sel kalus seolah-olah diselaputi oleh lapisan nipis yang merupakan sebab sukarnya pensubkulturan dilakukan pada kalus ini. K = sel kalus; L = lapisan nipis yang bersifat merekit	41
Gambar 11	:	Kalus lembut yang terhasil pada keseluruhan permukaan eksplan sub-apikal (4 hari selepas pengkulturan). Daripada segi morfologi, kalus ini berkeadaan berair, lembut dan jernih serta berciri embriogenik. K = kalus; S = eksplan	42
Mikrograf 12	:	Struktur sel bagi kalus lembut yang panjang dan longgar antara satu sama lain. Kedudukan yang longgar ini memudahkan proses pensubkulturan dijalankan. K = sel kalus	43
Gambar 13	:	Perbandingan kasar yang dilakukan terhadap pengaruh kepekatan 2,4-D di dalam komposisi medium terhadap pembentukan kalus oleh tisu eksplan. Kepekatan 3.0 mg/l merupakan kepekatan yang dapat mengaruh pembentukan kalus pada kuantiti yang terbanyak	45

Gambar 14	:	Kejadian pemerangan yang menyerang tisu eksplan daun muda. Pemerangan ini berupaya menyebabkan kematian tisu dan seterusnya menghentikan proses pengkulturan bagi penghasilan kalus.	46
Gambar 15	:	Pemerangan yang dialami oleh eksplan daun muda walaupun kalus telah dihasilkan. Kalus yang terhasil terpaksa dipindahkan ke medium baru bagi tujuan propagasi. K = kalus; D=eksplan	47
Gambar 16	:	Kesan penambahan 2.5 g/l arang teraktif ke dalam medium kultur terhadap proses pemerangan pada eksplan daun muda.	47
Gambar 17	:	Kawasan padat dan gelap ('cambium-like zone') terbentuk pada tisu kalus dengan lapisan sel-sel yang lebih longgar di sekelilingnya	49
Gambar 18	:	Pembahagian sel yang berterusan di permukaan kalus embriogenik yang telah menghasilkan beberapa lapisan sel yang kaya dengan sitoplasma dan nukleus yang nyata	50
Gambar 19	:	Sel-sel embriogenik yang terletak di permukaan tisu kalus telah mengalami pembahagian bagi pembentukan proembriod. P = proembriod	51
Gambar 20	:	Pemerhatian melalui kajian histologi terhadap kalus tebu yang menunjukkan pembentukan jasad multi-embrio apabila dikultur di atas medium percambahan embrio somatik	51
Gambar 21	:	Proembriod berbentuk hati	52
Mikrograf 22	:	Proembriod yang terbentuk pada tisu kalus embriogenik. Proembriod yang berbentuk semibulatan dan torpedo telah diperhatikan yang akan berkembang membentuk plantlet. E = proembriod; K = kalus	53
Gambar 23	:	Siri perkembangan sel embrio somatik bagi pembentukan plantlet; (a) meristem apeks masih berada dalam peringkat awal perkembangan; (b) pertumbuhan meristem apeks semakin jelas dan (c) pucuk berada di peringkat akhir perkembangan dan koleptil yang menutupinya hampir terbuka bagi memudahkan perkembangan pucuk. C = koleoptil; SC = skutela; Cr = koleoriza; MP = meristem pucuk; MA = meristem akar	54

Gambar 24	: Embrio somatik lengkap dengan skutela di sisi dan koleoptil yang berbentuk tiub yang mengelilingi meristem apeks. SC = skutela; C = koleoptil dan MP = meristem apeks	55
Gambar 25	: Pertumbuhan daun-daun kecil pada kalus yang dikultur di atas medium pengaruh pucuk (24 hari selepas pengkulturan). Taburan daun-daun kecil adalah secara rawak di atas permukaan kalus. D = daun ; K = kalus	56
Gambar 26	: Keratan menegak yang menunjukkan embrio somatik dengan kawasan meristem yang luas yang menghasilkan meristem apeks berbilang	56
Mikrograf 27	: Pembentukan awal meristem pucuk yang masih dikelilingi oleh koleoptil dan skutela. MP = meristem apeks; C = koleoptil ; SC = skutela	57
Mikrograf 28	: Struktur trikum yang terdapat pada permukaan skutela. T = trikum; SC = skutela	58
Mikrograf 29	: Pucuk awal yang terbentuk daripada perkembangan meristem apeks di atas permukaan kalus. K = permukaan kalus; D = daun awal	58
Gambar 30	: Pembentukan titik-titik merah pada kalus embriogenik yang dikultur di atas medium pengaruh akar. Titik-titik ini telah dikenalpasti sebagai tempat permulaan bagi pembentukan akar. M = titik merah ; K = kalus	59
Gambar 31	: Pembentukan akar daripada meristem akar pada embrio somatik. A = akar; K = kalus	60
Gambar 32	: Pembentukan akar daripada kalus padat yang dikultur di medium pengaruh akar. Pertumbuhan akar diperhatikan terjadi secara rawak daripada tisu kalus. A = akar; R = akar rerambut; D = eksplan	60
Gambar 33	: Plantlet lengkap tebu berusia 3 bulan yang dihasilkan melalui teknik kultur tisu	61
Gambar 34	: Plantlet tebu dipindahkan ke medium air bagi tujuan menguatkan sistem pengakaran	61
Gambar 35	: Pemindahan terakhir plantlet ke atas medium tanah	62
Gambar 36	: Variasi pada saiz daun yang telah diperhatikan wujud di antara plantlet yang terhasil	63

Gambar 37	:	Plantlet yang mengalami variasi pada warna daun yang berjalur putih. V = plantlet bervariasi; H = plantlet normal	64
Gambar 38	:	Variasi ketinggian dan bentuk daun. H = plantlet sehat; T = plantlet yang mempunyai daun yang halus dan tinggi; P = plantlet yang mempunyai daun yang bergulung ; N = plantlet yang berdaun tisu di hujung dan bersaiz kecil	64
Gambar 39	:	Pembentukan awal hifa di atas permukaan plantlet (2 hari selepas inokulasi). Tiada tanda-tanda jangkitan yang jelas dalam bentuk nekrosis atau lesion. Keadaan daun masih normal dan hijau. H = hifa; D = daun	66
Mikrograf 40	:	Pembentukan struktur konidiofor dan konidia (2 hari selepas inokulasi) yang merupakan struktur pembiakan aseks bagi <i>F. moniliforme</i> . Kf = konidiofor; K = konidia	66
Gambar 41	:	Seluruh permukaan daun diliputi dengan jaringan hifa <i>F.moniliforme</i> (7 hari selepas inokulasi). Warna pada dasar daun bertukar ke warna kekuningan yang menandakan kejadian nekrosis sel. DD = dasar daun; H = hifa.	67
Gambar 42	:	Perebakan jaringan hifa di atas permukaan kalus (2 hari selepas inokulasi). Kalus telah mengalami pemerangan yang menyebabkannya keadaannya berair. D = daun; H = hifa ; C = kalus.	68
Mikrograf 43	:	Jangkitan hifa <i>F.moniliforme</i> melalui stomata (2 hari selepas inokulasi). Pertumbuhan pesat hifa telah diperhatikan dengan pembentukan struktur konidiofor berhampiran dengan stomata. S = stomata; H = hifa; Kf = konidiofor.	70
Gambar 44	:	Keratan rentas daun tebu yang dilitupi oleh hifa <i>F.moniliforme</i> di kedua-dua permukaan epidermisnya (2 hari selepas inokulasi). H = hifa; D = daun; EA = epidermis atas; EB = epidermis bawah	71
Gambar 45	:	Proses penembusan hifa <i>F.moniliforme</i> ke dalam tisu daun tebu melalui bukaan stomata. Pembentukan agregat miselium telah diperhatikan di antara sel-sel mesofil daun (2 hari selepas inokulasi). H = hifa; S = stomata; A = agregat miselium; EA = epidermis atas; EB = epidermis bawah.	71
Gambar 46	:	Keratan memanjang tisu daun setelah lapisan miselium yang menutupinya ditanggalkan (7 hari selepas inokulasi). H = hifa; D = tisu daun; E = epidermis	72

Gambar 47	: Gambar keratan memanjang tisu daun yang mengalami kerosakan teruk dan diselangi dengan agregat-agregat miselium di antara sel-selnya (7 hari selepas inokulasi). H = hifa; A = agregat; D = tisu daun (sel-sel mesofil daun)	73
Mikrograf 48	: Hifa yang menjalar berhampiran dengan bukaan stomata tanpa memasukinya. H = hifa; S = stomata.	74
Mikrograf 49	: Kehadiran hifa dan stomata yang berhampiran tanpa terjadinya proses penjangkitan. H = hifa ; S = stomata.	74
Mikrograf 50	: (a)Penjangkitan hifa melalui luka yang terdapat pada tisu daun. Konidia daripada konidiofor didapati menduduki luka dan akan bercambah sekiranya keadaan bersesuaian; (b)Luka yang terdapat pada tisu daun digunakan untuk aktiviti penembusan oleh hifa dan (c) Penembusan hifa melalui rekahan yang terjadi di antara sel-sel. H = hifa; R = rekahan; L = luka; K = konidia	75
Mikrograf 51	: Penjangkitan secara terus oleh hifa ke dalam sel melalui liang antara sel pada kawasan yang mempunyai lapisan epidermis yang masih muda. Corak jangkitan ini melibatkan kehadiran enzim bagi meluluhkan struktur epidermis. H = hifa; L = liang antara sel.	76

PENGHARGAAN

Bersyukur ke hadrat Ilahi kerana dengan limpah rahmatnya saya selesai menyiapkan tesis sarjana ini dengan penuh ketenangan. Ucapan ribuan terima kasih saya tujukan terutamanya kepada Prof. Madya Dr. Md. Nor Salleh, Pengarah Pusat Pendidikan Jarak Jauh, di atas kesudian beliau menyemak tesis ini pada peringkat akhir penyediaannya. Kepada Dr. Nik Norulaini Nik Ab. Rahman, selaku penyelia projek ini dan tidak dilupakan juga Dr. Mohd. Omar Abd. Kadir yang berperanan sebagai pengkritik luar dari bidang biologi yang secara tidak langsung telah banyak membantu saya dalam menghasilkan ide-ide baru di sepanjang projek ini dijalankan.

Seterusnya, ucapan terima kasih saya kepada kedua ayah dan mak yang dikasihi lagi dihormati serta adik-adik tersayang yang tidak pernah jemu memberikan galakan serta sokongan kepada saya sejak pemulaan projek sehingga tesis ini berjaya disiapkan. Sesungguhnya, kata-kata perangsang yang telah diberikan itu telah memberikan kekuatan kepada diri ini untuk melakukan yang terbaik dalam segenap lapangan. Inshaallah, akan saya ingati di sepanjang hidup ini.

Kepada Kak Mid tersayang, sesungguhnya kehadiranmu di saat-sat terakhir tesis ini disiapkan amat bermakna bagi diri ini. Sukar rasanya untuk membalas segala pengorbanan dan sokongan moral yang telah diberikan. Terima kasih.

Penghargaan ini juga ingin saya tujukan kepada pihak Gula Padang Terap Berhad (GPTB), selaku pembekal tebu bagi kegunaan projek ini. Selain itu, terima kasih juga di atas kesudian pihak GPTB membiayai perbelanjaan saya ke Bangladesh bagi pembentangan kertas kerja. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada Encik Zakaria yang telah sudi membekalkan tebu kuning di sepanjang projek ini dijalankan.

Seribu penghargaan saya kepada pihak-pihak yang terlibat sama ada secara langsung atau tidak langsung dalam menjayakan projek sarjana ini iaitu Makmal Mikroskop Penskanan Elektron, Makmal Histologi dan Bilik Fotografi di Pusat Pengajian Sains Kajihayat, U.S.M. Segala bantuan yang telah diberikan amat bererti bagi saya, terima kasih.

Kehadiran rakan-rakan seperjuangan yang memahami juga telah memberikan semangat kepada saya dalam menghadapi masalah-masalah yang timbul. Di sini saya ingin merakamkan setinggi-tinggi penghargaan kepada Kak Astimar, Kak Su, Kak Anis, Shariza dan rakan-rakan di Makmal G07/016.

~TERIMA KASIH UNTUK SEMUA~

Afizah Ayob

Julai 1997

ABSTRAK

Tiga jenis eksplan yang digunakan di dalam kajian ini ialah eksplan daun muda, meristem apeks dan meristem sub-apeks. Hasil pengkulturan yang telah dibuat, tiga jenis kalus telah dikenalpasti iaitu kalus padat, kalus lembut dan kalus bermusilaj. Dua jenis kalus yang pertama berciri embriogenik. Perbandingan yang telah dijalankan menunjukkan bahawa eksplan daun muda berupaya menghasilkan kalus-kalus embriogenik apabila dikultur di atas medium MS dengan kehadiran auksin 2,4-D (asid 2,4-dikloro fenoksi asetik) dan arang teraktif. Kalus telah dihasilkan dalam kuantiti yang tertinggi apabila eksplan dikulturkan di atas medium MS + 3.0 mg/l 2,4-D dan 2.5 g/l arang teraktif. Proses embriogenesis somatik telah dicapai dengan pengkulturan kalus embriogenik di atas medium MS + 0.25 mg/l kinetin + 2.5 g/l arang teraktif bagi pembentukan pucuk-pucuk berbilang. Medium MS + 5.0 mg/l NAA (asid α -naftalena asetik) berserta 2.5 g/l arang teraktif pula telah digunakan bagi pengaruh akar. Walau bagaimanapun, penambahan 7% sukrosa di dalam medium ini telah berjaya menambah kuantiti akar yang dihasilkan. Proses embriogenesis somatik telah menghasilkan embrio somatik lengkap yang terdiri daripada skutela, koleoptil, meristem pucuk, koleoriza dan meristem akar daripada kalus embriogenik. Plantlet lengkap telah terhasil dalam tempoh 3 bulan daripada tempoh pengkulturan eksplan. Kehadiran variasi somaklon telah diperhatikan pada plantlet-plantlet yang merangkumi ciri-ciri seperti warna dan bentuk daun serta ketinggian plantlet. Kaedah penginokulan *in vitro* ampai konidia *Fusarium moniliforme* (6.7×10^6 konidia/ml) yang telah dijalankan terhadap tisu tebu telah menunjukkan bahawa corak penjangkitan terjadi melalui tiga laluan utama iaitu stomata, luka dan jangkitan secara terus ke dalam tisu daun. Walaupun begitu, terdapat juga pemerhatian-pemerhatian yang menunjukkan hifa hanya sekadar melintasi bukaan stomata dan luka tanpa memasukinya. Keratan tisu menunjukkan kehancuran sel dalam 7 hari selepas jangkitan.

SOMATIC EMBRYOGENESIS AND *IN VITRO* INOCULATION OF SUGARCANE (*Saccharum officinarum*) WITH FUNGUS

ABSTRACT

Three types of explants used in this experiment were spindle, apical meristem and sub-apical meristem. From the culturing process, the production of calli were identified as compact callus, soft callus and mucilagenous callus. The first two calli are embryogenic. From the comparison done, the spindle explant was capable in producing the embryogenic calli when cultured on the MS medium with the presence of 2,4-D (2,4-dichloro phenoxy acetic acid) and activated carbon. Explants on the MS medium + 3.0 mg/l 2,4-D and 2.5 g/l activated carbon produced the largest quantity of calli. Somatic embryogenesis process was achieved through the culturing of embryogenic callus on the MS medium + 0.25 mg/l kinetin + 2.5 g/l activated carbon for the purpose of multiple shoots formation. MS medium + 5.0 mg/l NAA (α -Naphthalene acetic acid) and 2.5 g/l activated carbon were used in roots induction. However, the additional of 7% of sucrose in this medium increased the quality of roots produced. The somatic embryogenesis process produced the complete somatic embryo which consists of scutellum, coleoptile, shoot meristem, coleorhiza and root meristem from the embryogenic callus. A complete plantlet was produced within 3 months of culturing. The presence of somaclonal variation were observed amongst plantlets which include these characteristic; colour and shape of the leaves, as well as the height of the plantlets. *In vitro* inoculation of *Fusarium moniliforme* conidial suspension (6.7×10^6 con/ml) which was carried out on the plantlets showed that the infection occurred via 3 ways vis stomates, wound and direct infection into the host tissue. However, in a few instances the hyphae just passed over the openings without entering. Cell destructions were observed 7 days after infection.

BAB 1

PENGENALAN

1.1 TANAMAN TEBU

Tebu merupakan tanaman monokotiledon tropika, mempunyai ketinggian 3-4 m, batang berdiameter lebih kurang 3 cm dan berbeza mengikut varieti. Tebu ditanam untuk mendapatkan ekstrak gula daripada batangnya. Tebu diklasifikasikan di dalam genus *Saccharum*, famili Gramineae, sub-kumpulan Saccharininae dan kumpulan Andropogonea. *S.robustum* dan *S.spontaneum* merupakan spesies tebu terawal yang berasal dari New Guinea (Blackburn, 1984; Tan, 1989).

Kajian oleh Tan (1989) menunjukkan kawasan penanaman tebu di Malaysia ialah seluas 16,802 hektar (Jadual 1.1) di mana yang paling luas terdapat di Kedah. Tan (1989) juga melaporkan terdapat 240 varieti tebu dan 146 jenis klon di Malaysia.

Jadual 1.1 : Penggunaan tanah bagi penanaman tebu di Malaysia (1985)

Sektor	Keluasan kawasan (hektar)			
	Perlis Plantation	Gula Padang Terap	FELDA	Jumlah
Ladang	4,615	4,297	4,656	15,668
Pekebun kecil	0	1,134	0	1,134
Jumlah	4,615	7,531	4,656	16,802

Sumber : Tan (1989)

Bekalan gula di Malaysia bergantung kepada pemprosesan tebu tempatan dan gula mentah yang diimport daripada negara-negara jiran seperti Thailand, Filipina dan Australia. Cuba merupakan pengeksport gula terbesar di dunia diikuti oleh Argentina, Australia, Hawaii, Mauritius, Fiji, Jamaica dan Taiwan (Peng, 1984). Thailand merupakan pengeluar gula terbesar di rantau ASEAN seperti ternyata di dalam Jadual 1.2 (Tan, 1989), diikuti dengan Filipina dan Indonesia.

Jadual 1.2 : Bekalan gula ASEAN 1984/85 ('000 tan)

Negara	Pengeluaran	Import	Eksport
Indonesia	1,600	165	0.0
Malaysia	65	465	50.0
Filipina	1,900	0	1,000.0
Singapura	0	428	4.6
Thailand	2,513	0	1,400.0
Jumlah	6,078	749	2,454.6

Sumber : Tan (1989)

Penghasilan gula yang berkualiti dan berkuantiti tinggi merupakan objektif utama para penanam yang terlibat secara langsung dalam industri gula. Walau bagaimanapun, dengan kaedah penanaman konvensional yang dipraktikkan sekarang, masa merupakan masalah utama bagi para penanam. Sesuatu usaha membaikpulih yang dilakukan memerlukan masa yang panjang untuk mendapatkan keputusan. Usaha-usaha membaikpulih yang dimaksudkan merangkumi penghasilan varieti yang rintang penyakit, mempunyai kadar pengeluaran yang tinggi dan tahan kepada faktor-faktor persekitaran seperti angin dan cuaca yang boleh mempengaruhi pertumbuhan tebu.

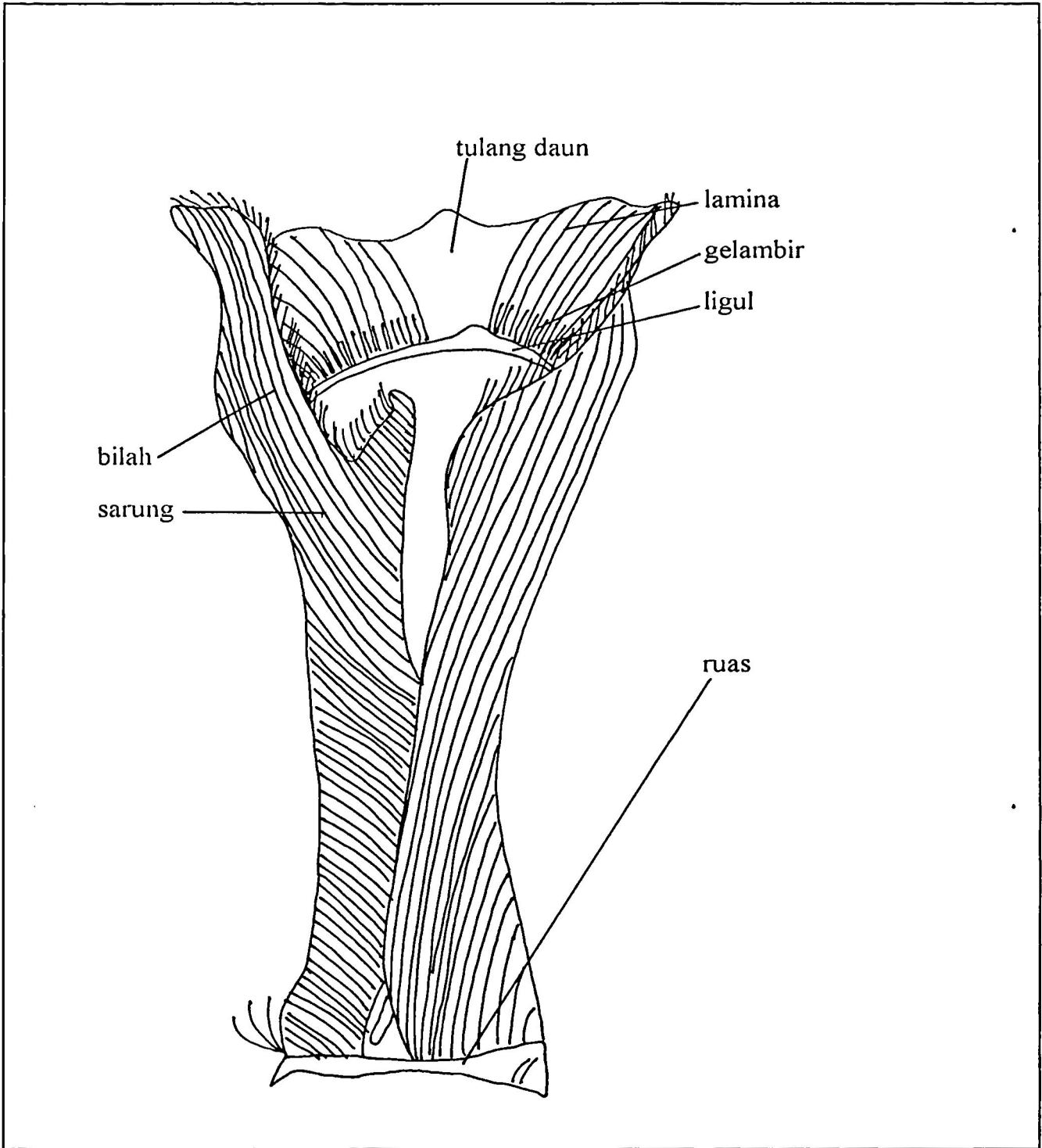
Penanaman varieti-varieti yang tidak rintang terhadap penyakit membolehkan jangkitan penyakit terjadi yang akan mempengaruhi kualiti gula yang terhasil. Jangkitan penyakit pada tebu boleh disebabkan oleh serangan serangga dan jangkitan kulat, virus serta bakteria (Peng, 1984).

1.2 KULTUR TISU TEBU

Teknik kultur tisu tebu telah banyak dijalankan oleh para penyelidik sejak tahun 1960an secara pembiakbakaan melalui kaedah bioteknologi seperti mutasi dan kejuruteraan genetik (Ho & Vasil, 1983a,b ; Nadar & Heinz, 1977; Chen *et al.*, 1988).

Daun merupakan bahagian tebu terpenting dalam kultur tisu selain daripada meristem apeks dan tisu parenkima yang digunakan sebagai eksplan. Daun tebu terdiri daripada tulang daun, sarung dan bilah yang merupakan bahagian-bahagian penting

dalam pembentukan kalus pada eksplan daun muda (Rajah 1.1). Daun tebu yang berjarak 5 cm daripada apeks adalah yang terbaik bagi penghasilan kalus embriogenik.



Rajah 1.1 : Struktur daun tebu (Blackburn, 1984)

Bahagian yang sering digunakan sebagai eksplan ialah daun muda (Ho & Vasil, 1983b, Nadar *et al.*, 1978; Cheema *et al.*, 1992; Ahloowalia & Maretzki, 1983), meristem apeks (Heinz & Mee, 1970; Ahloowalia & Maretzki, 1983; Liu *et al.*, 1982), tisu parenkima (Heinz *et al.*, 1977; Heinz & Mee, 1969, 1971) dan tunas sisi (Cheema *et al.*, 1992; Peros *et al.*, 1990).

Satu fenomenon yang sering diperhatikan daripada kajian-kajian yang telah dijalankan ialah embriogenesis somatik (Ho & Vasil, 1983a; Guiderdoni & Demarly, 1988; Ahloowalia & Maretzki, 1983). Dalam kajian-kajian yang telah dijalankan, plantlet telah diperhatikan terhasil daripada kalus yang telah mengalami proses embriogenesis somatik (Ahloowalia & Maretzki, 1983; Ho & Vasil, 1983a). Hasil daripada kajian yang telah dijalankan juga menunjukkan yang pemanjangan tempuh kultur bagi kalus (Ahloowalia & Maretzki, 1983) dan penambahan asid 2,4-dikloro fenoksi asetik (2,4-D) berupaya mewujudkan embriogenesis somatik pada plantlet.

Kajian-kajian lain terhadap tanaman tebu yang telah dijalankan melibatkan kajian kultur ampai kalus tebu (Heinz & Mee, 1970; Ho & Vasil, 1983a) dan pertumbuhan semula (Chen *et al.*, 1988; Cheema *et al.*, 1992; Ho & Vasil, 1983a; Heinz & Mee, 1969; 1971).

Para penyelidik juga telah menemui beberapa jenis kalus yang berbeza daripada segi morfologi dan keupayaan membentuk embrio dan plantlet (Liu *et al.*, 1982; Nadar *et al.*, 1978; Ho & Vasil, 1983b). Menurut Ho & Vasil (1983b), kalus-kalus yang telah diperhatikan adalah terdiri daripada kalus padat ('compact callus'), kalus lembut ('soft callus') dan kalus bermusilaj ('mucilagenous callus') yang membawa ciri embriogenik dan tidak embriogenik masing-masing.

Kejayaan teknik kultur tisu tebu telah membuka jalan kepada para penyelidik untuk mempraktikkan proses pertumbuhan semula tebu bagi tujuan pembiakan (Heinz *et al.*, 1977; Nadar & Heinz, 1977) dan penghasilan tanaman rintang penyakit (Fereol, 1984; Rott & Chagvardieff, 1987; Peros *et al.*, 1990).

1.3 PENYAKIT TEBU

Terdapat 42 jenis penyakit yang menyerang tanaman tebu di Malaysia (Tan, 1989), 22 adalah melalui jangkitan kulat, 4 melalui jangkitan bakteria, 3 melalui jangkitan virus dan selebihnya masih belum diketahui. Tan (1989) juga melaporkan bahawa kebanyakan penyakit tebu di Malaysia lebih banyak melibatkan serangan pada bahagian daun berbanding dengan bahagian lain. Di antara penyakit tebu yang ditemui ialah :-

(a) Penyakit luka api

Penyakit ini disebabkan oleh kulat *Ustilago scitaminea* Syd yang menghasilkan pucuk muda tebu yang bergulung dan berspora hitam. Jangkitan penyakit ini adalah melalui penyebaran spora oleh angin.

(b) Penyakit Fiji

Penyakit Fiji terjadi melalui jangkitan virus *Galla fijiensis*, dibawa oleh vektor *Perkinsiella saccharicida* Kirk yang membiak di rumpun tebu. Simptom bagi penyakit ini ialah pembentukan benjolan panjang berwarna kuning pada bahagian tulang daun yang menyebabkan tumbesaran tanaman terbantut.

(c) Penyakit ringkai daun

Stagnospora sacchari merupakan kulat yang menyebabkan jangkitan penyakit ini terhadap tanaman tebu melalui penyebaran konidia oleh angin dan air. Pembentukan bintik-bintik kemerahan pada dasar daun muda diikuti dengan kematian tisu-tisu yang terjangkit merupakan simptom-simptom penyakit ini.

(d) Penyakit 'Pokkah Boeng'

Penyakit yang menyerang tanaman tebu di seluruh dunia. Ia disebabkan oleh jangkitan kulat *Fusarium moniliforme* pada daun dan batang tebu. Simptomnya ialah dengan terbentuknya daun-daun muda yang terbantut tumbesarannya, bergulung dan berwarna hijau tua.

Melalui laporan yang diperolehi (Tan, 1989), didapati penyakit-penyakit tebu telah dikawal dengan tindakan bahan kimia secara penyemburan racun dan pemusnahan tanaman yang terjangkit.

Penyelidikan yang melibatkan bidang-bidang kejuruteraan genetik dan kultur tisu telah berjaya diaplikasikan bagi penghasilan varieti-varieti rintang penyakit. Bagi tanaman tebu, banyak kerja-kerja penyelidikan yang mengkhusus kepada dua bidang ini telah dijalankan (Fereol, 1984; Nadar, *et al.*, 1978; Nadar & Heinz, 1977; Liu *et al.*, 1982) yang merangkumi penghasilan plantlet kultur tisu tebu dan penginokulatannya dengan patogen-patogen.

Salah satu kaedah yang digunakan bagi mendapatkan varieti yang rintang penyakit melibatkan kejadian variasi somaklon (Scowcroft & Larkin, 1982) yang wujud hasil daripada proses pengkulturan. Menurut mereka, tanaman tebu merupakan tanaman pertama yang menunjukkan variasi somaklon pada plantlet yang terhasil. Selain daripada itu, penyaringan penyakit secara *in vitro* iaitu melalui penginokulatan buatan juga merupakan kaedah yang sering digunakan bagi penghasilan varieti rintang (Brettell & Ingram, 1979; Joung *et al.*, 1987; Helgeson *et al.*, 1972)

1.4 PENGINOKULATAN *IN VITRO*

Penginokulatan *in vitro* adalah kaedah jangkitan buatan patogen pada perumah dalam keadaan *in vitro*. Berbanding dengan keadaan *in vivo*, penjangkitan patogen-perumah *in vitro* boleh dilakukan dalam keluasan yang sedikit dan pemerhatian yang lebih berkesan dapat dibuat. Kaedah penginokulatan *in vitro* mempunyai beberapa kebaikan iaitu penggunaan ruang kerja yang terkawal, kesterilan yang terjaga dan memberikan pemerhatian yang jelas di mana jangkitan yang diperhatikan adalah hasil daripada jangkitan oleh patogen yang digunakan secara mutlak tanpa gangguan mikroorganisma luar.

Kajian telah dijalankan oleh Fereol (1984) dengan menggunakan kulat *Ustilago scitaminea* iaitu patogen penyakit luka api pada tanaman tebu. Kajian tentang corak

jangkitan kulat ini terhadap tisu tebu secara *in vitro* telah menunjukkan simptom yang sama dengan tanaman yang dijangkiti di lapangan (*in vivo*).

Penginokulatan *in vitro* juga telah dijalankan terhadap asparagus. Di dalam kajiannya, Nik (1992a) telah menggunakan larutan ampai konidia *Fusarium oxysporum* yang merupakan patogen kepada asparagus sebagai inokulum. Pemerhatian yang diperolehi daripada kajian ini menunjukkan yang penembusan hifa ke dalam tisu perumah telah menghasilkan nekrosis pada tisu.

Keadaan nekrosis diperhatikan bertambah dengan pertambahan tempoh penginokulatan. Pemerhatian terhadap keratan rentas yang telah dibuat terhadap tisu yang dijangkiti menunjukkan yang jangkitan terjadi pada lapisan sub epidermis melalui bukaan stomata.

Tisu daun kentang yang telah diinokulatkan dengan *Phytophthora infestans* pula menunjukkan pertumbuhan hifa di dalam lapisan epidermis luarnya selari dengan permukaan daun (Hohl & Suter, 1976). Kajian yang telah dijalankan dengan menggunakan larutan ampai zoospora patogen itu telah berjaya menghasilkan tanaman kentang yang rintang kepada jangkitan patogen ini.

Kajian-kajian yang telah dijalankan menunjukkan bahawa kaedah penginokulatan *in vitro* berupaya dijadikan titik permulaan kajian tentang jangkitan patogen pada tisu tumbuhan. Dalam kajian ini, penginokulatan *in vitro* digunakan untuk mengkaji corak jangkitan *Fusarium moniliforme* terhadap tisu tebu.

1.5 *Fusarium moniliforme*

F. moniliforme merupakan sejenis fungus yang bertindak sebagai patogen kepada beberapa jenis penyakit tebu. Penyakit layu daun merupakan satu daripada penyakit tebu yang disebabkan oleh fungus ini. Tanaman yang dijangkiti akan menunjukkan tanda-tanda layu pada daun dan tumbesaran yang terbantut (Babu, 1979).

Fungus ini juga berupaya bergabung dengan *Colletotrichum falcatum* bagi menyebabkan penyakit reput merah pada tebu (Humbert, 1968). Tebu yang dijangkiti

reput merah akan menunjukkan simptom-simptom seperti daun lecur, perubahan warna pada daun dan keadaan daun yang kering.

Menurut Blackburn (1984), *F. moniliforme* juga bertindak sebagai patogen kepada penyakit reput batang. Penyakit reput batang merupakan penyakit yang menjangkiti tanaman tebu melalui potongan-potongan tunas dan boleh menyebabkan penurunan pengeluaran.

Selain daripada penyakit-penyakit yang telah disebutkan di atas, kulat *F. moniliforme* juga merupakan patogen penyakit 'pokkah boeng' yang sering menyerang tanaman tebu (Blackburn, 1984). Penyakit ini akan menyebabkan keadaan klorotik pada bahagian dasar daun, perencatan saiz bagi daun muda dan batang.

1.6 OBJEKTIF PROJEK

Objektif-objektif projek yang telah dijalankan ialah :

1. Menghasilkan plantlet tebu melalui teknik kultur tisu secara pembentukan kalus dan embriogenesis somatik
2. Mengkaji corak jangkitan penyakit 'pokkah boeng' oleh fungus *F. moniliforme* terhadap tanaman tebu melalui teknik penginokulatan *in vitro*.

BAB 2

TINJAUAN BACAAN

2.1 KULTUR TISU TEBU

2.1.1 Pemilihan eksplan

Eksplan ialah bahagian tisu tumbuhan yang digunakan sebagai permulaan untuk membentuk kalus (Stafford, 1991) yang akan membentuk plantlet. Pemilihan bahagian tumbuhan yang akan digunakan sebagai eksplan berbeza mengikut jenis tumbuhan.

Bahagian-bahagian yang sering digunakan sebagai eksplan kultur tisu ialah daun muda (pucuk), embrio dan tunas sisi. Daun muda merupakan bahagian yang paling banyak digunakan sebagai eksplan (Padmanabhan *et al.*, 1974). Kajian-kajian kultur tisu terdahulu menunjukkan bahawa sel-sel kalus daripada eksplan daun muda boleh diperolehi daripada banyak tumbuhan misalnya kopi (Yasuda *et al.* 1985), manggis (Goh *et al.*, 1990), kelapa sawit (Nualsri *et al.*, 1988); kurma (Sahavacharin & Suwanaro, 1988) dan tomato (Behki & Lesley, 1976).

Selain daripada daun muda, bahagian lain yang digunakan sebagai eksplan ialah tunas sisi pada tisu kopi (Yasuda *et al.*, 1985), embrio pada kurma (Sahavacharin & Suwanaro, 1988) dan jagung (Green & Phillips, 1975; Green *et al.*, 1974).

Eksplan yang sering digunakan dalam kultur tisu tebu ialah daun muda (Ho & Vasil, 1983b; Nadar *et al.*, 1978; Cheema *et al.* 1992; Ahloowalia & Maretzki, 1983; Chen *et al.*, 1988; Gnanaprasagam & Vasil, 1990; Liu *et al.*, 1982; Guiderdoni & Demarly, 1988; Peros *et al.*, 1990; Heinz & Mee, 1969), meristem apeks (Heinz & Mee, 1970, Ahloowalia & Maretzki, 1983; Liu *et al.*, 1982), tisu parenkima (Heinz *et al.*, 1977; Heinz & Mee, 1969, 1971), tunas sisi (Cheema *et al.*, 1992; Peros *et al.*, 1990) dan bunga (Heinz & Mee, 1969).

Ho & Vasil (1983a) menggunakan eksplan daun muda dalam kajian pembentukan embriogenesis somatik dalam tisu tebu. Kajian telah dijalankan tentang morfologi dan fisiologi pembentukan kalus pada tanaman tebu yang membawa kepada pembentukan embrio somatik.

Bahagian meristem apeks yang terletak di bahagian teratas batang tebu juga merupakan eksplan yang sering digunakan dalam penyelidikan kultur tisu tebu. Heinz & Mee (1970) menggunakan bahagian ini untuk menghasilkan kalus yang digunakan dalam kajian penggandaan kromosom tisu tebu.

Walau bagaimanapun, kajian oleh Chen *et al.* (1988) menunjukkan bahawa pemilihan daun muda sebagai eksplan adalah lebih baik untuk menghasilkan kalus yang berciri embriogenik jika dibandingkan dengan bahagian-bahagian lain. Mereka juga mendapati bahagian meristem apeks lebih banyak menghasilkan kalus tidak embriogenik. Memandangkan bahagian meristem apeks merupakan kawasan yang bebas virus, eksplan ini sering digunakan bagi menghasilkan satu klon tanaman yang bebas virus bagi tujuan penyelidikan dan pembaikpulihan tanaman (George & Sherrington, 1984).

Laporan daripada Cheema *et al.* (1992) menyatakan bahawa eksplan meristem apeks mengambil masa empat kali lebih lama daripada eksplan daun muda untuk menghasilkan kalus. Laporan ini juga menyatakan bahawa eksplan tunas sisi mengambil masa yang lebih lama untuk membentuk kalus iaitu selepas dua minggu dikultur.

2.1.2 Pembentukan kalus

Kalus merupakan sel-sel tidak berorganisasi yang membiak pada segmen kultur tumbuhan (eksplan). Pembentukannya merupakan tindak balas sel yang terluka (Smith, 1992; Torres, 1957).

Pembentukan kalus daripada tisu eksplan yang dikultur mengambil masa yang berbeza bergantung kepada jenis tumbuhan. Penyelidikan terdahulu (Ho & Vasil, 1983b; Liu *et al.*, 1982; Chen *et al.*, 1988) terhadap tanaman tebu menunjukkan kalus terbentuk selepas empat hari dikultur di atas medium.

Tempoh yang lebih panjang diperlukan oleh pucuk muda manggis (Goh *et al.*, 1990) untuk membentuk kalus iaitu 4 minggu daripada tarikh pengekspelan, 8 hingga 10 hari bagi tomato (Padmanabhan *et al.*, 1974) dan 16 minggu bagi kopi (Yasuda *et al.*, 1985). Kajian Green & Phillips (1975) mendapati jagung (juga merupakan tanaman monokot) mengambil masa 14 hari untuk membentuk kalus yang padat dan berwarna putih kekuningan.

Menyentuh tentang bahagian pembentukan kalus, bahagian bawah daun tebu lebih cenderung jika dibandingkan dengan bahagian atas (Ho & Vasil, 1983b; Liu *et al.*, 1982). Kajian terhadap jagung oleh Green *et al.* (1974) yang menggunakan biji benih sebagai eksplan, menunjukkan bahawa titik permulaan pembentukan kalus tanaman ini adalah pada bahagian radikal dan koleoptil.

Melalui kajian histogenesis oleh Liu *et al.* (1982), pemerhatian terhadap permulaan pembentukan kalus telah dibuat pada eksplan tebu yang dikultur. Didapati bahagian daun muda yang terletak paling hampir dengan meristem apeks tidak menunjukkan perbezaan ketara daripada segi struktur daunnya.

Pada tahap ini keadaan daun terdiri daripada sel-sel buliform di bahagian epidermis atas dan pembentukan xilem serta floem masih terlalu awal untuk dilihat kewujudannya. Pembentukan kalus pada daun muda yang dikultur disebabkan oleh keadaan tumbesaran tisu daun yang telah terganggu dengan kehadiran bahan-bahan nutrisi di dalam medium.

Selain itu, tahap pembentukan kalus juga berbeza di antara bahagian-bahagian daun. Pembesaran tidak normal yang paling ketara adalah pada bahagian tisu vaskular. Pada bahagian ini, sel-sel parenkima yang akan membentuk tisu floem telah menunjukkan aktiviti meristematik yang tinggi dan dikenalpasti sebagai bahagian permulaan bagi pembentukan kalus bagi tebu.

Pemerhatian oleh Liu *et al.* (1982) yang telah dikuatkan lagi dengan pemerhatian oleh Guiderdoni & Demarly (1988) melalui kajian histogenesis menunjukkan yang pembentukan kalus bermula dengan pembahagian sel-sel parenkima pada tisu vaskular yang terletak berhampiran dengan floem.

Kehadiran auksin sebagai komposisi medium adalah penting sebagai penggalak untuk pertumbuhan kalus (Ho & Vasil, 1983b; Ammirato, 1983). Asid 2,4-dikloro fenoksi asetik (2,4-D) merupakan auksin yang sering digunakan bagi tebu (Ho & Vasil, 1983b), manggis (Goh *et al.*, 1990), kelapa sawit (Nualsri *et al.*, 1988), jagung (Green *et al.*, 1974; Green & Phillips, 1975) dan kurma (Sahavacharin & Suwanaro, 1988).

Chen *et al.* (1988) melaporkan bahawa kepekatan 2,4-D di dalam medium dan keadaan semulajadi eksplan dapat mempengaruhi pembentukan dan jenis kalus yang akan terhasil. Menurutnya, tiada pembentukan kalus diperhatikan pada eksplan yang dikultur di atas medium tanpa kehadiran 2,4-D sebaliknya kalus terbentuk pada eksplan yang dikultur di atas medium dengan auksin selepas empat hari. Kepekatan 3 mg/l auksin 2,4-D merupakan yang terbaik untuk menghasilkan kalus tebu (Nadar *et al.*, 1978; Nadar & Heinz, 1977; Cheema *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1982; Ho & Vasil, 1983b; Ahloowalia & Maretzki, 1983; Liu *et al.*, 1982).

Walau bagaimanapun, hasil daripada kajian yang telah dijalankan oleh Chandra (1996) tentang pengaruh 2,4-D terhadap pembentukan kalus tebu daripada eksplan daun muda menunjukkan yang kehadiran auksin ini pada kepekatan yang tinggi akan lebih cenderung kepada pembentukan kalus bermusilaj berbanding kalus yang bersifat embriogenik. Di dalam kajiannya, beliau telah menggunakan 2,4-D pada kepekatan 0.5-5.0 mg/l dalam medium MS dengan kehadiran 2.5 g/l karbon teraktif bagi tujuan pengaruhan kalus.

Kehadiran kinetin di dalam medium bagi alfalfa berupaya menentukan jenis kalus yang terbentuk. Menurut Miller *et al.* (1984) kalus yang dikultur di atas medium yang mengandungi 4 mg/l kinetin lebih rapuh dan kering jika dibandingkan dengan medium tanpa kehadiran sitokinin ini.

Auksin-auksin lain yang pernah digunakan untuk tujuan yang sama termasuk asid α -naftalena asetik (NAA) bagi kopi (Yasuda *et al.*, 1985), tomato (Behki & Lesley, 1976), dan 6-benzil amino purina (BAP) bagi tomato (Goh *et al.*, 1990) dan tebu (Chandra, 1996).

Walau bagaimanapun, penggunaan 2,4-D harus dihadkan kerana ia dapat merangsang mutasi dalam kultur (Teo, 1992). Penambahan 0.1 atau 0.5 mg/l 2,4-D dan 60 g/l sukrosa (Ahloowalia & Maretzki, 1983), NAA, asid absisik (ABA) dan BAP (Chen *et al.*, 1988) juga menyebabkan perencatan pertumbuhan kalus tebu. Penambahan ini juga menyebabkan kalus bertukar menjadi ungu dan terjadi nekrotik serta tiada pembezaan plantlet yang terbentuk.

2.1.3 Jenis-jenis kalus

Secara umum, kalus kultur tisu dapat dikategorikan kepada kalus berciri embriogenik dan tidak embriogenik. Kalus embriogenik adalah kalus yang berupaya membentuk embrio somatik untuk menghasilkan plantlet. Terdapat dua jenis kalus bagi tebu yang mempunyai ciri embriogenik iaitu kalus padat dan kalus lembut (Ho & Vasil, 1983b) yang terhasil daripada eksplan daun muda dan meristem apeks.

Keadaan berbeza diperhatikan pada kopi (Yasuda *et al.*, 1985), jagung dan oat (Somers *et al.*, 1988) yang hanya menghasilkan kalus jenis embriogenik. Jagung dan oat mempunyai corak penghasilan kalus yang hampir sama.

Yasuda *et al.* (1985) telah memerhati pembentukan kalus-kalus embriogenik yang terhasil pada kopi adalah terdiri daripada kalus padat pada medium yang berkompisiti 93.1 mg/l NAA. Walau bagaimanapun, kalus-kalus padat ini sukar untuk disubkultur dan sering diserang masalah pemerangan. Selain daripada kalus padat, kalus rapuh juga membawa ciri embriogenik bagi kopi. Kalus ini terbentuk selepas 16 minggu pengkulturan di atas medium yang mempunyai 1.13 mg/l 6-benzil-aminopurina (BA).

2.1.4 Pembentukan kalus embriogenik

Kalus embriogenik adalah kalus yang berupaya untuk membentuk embrio seterusnya plantlet. Pembentukan kalus bergantung kepada beberapa faktor dan bagi sesetengah tanaman, tidak semua kalus yang terhasil bersifat embriogenik.

Frekuensi dan pembentukan kalus embriogenik bagi tebu bergantung kepada faktor-faktor seperti umur daun yang digunakan sebagai eksplan dan jaraknya dari dasar

daun (Ho & Vasil, 1983b). Kajian oleh Ho & Vasil (1983b) mendapati bahawa daun-daun muda yang terletak hampir dengan apeks (lapisan daun pertama dan kedua) hanya akan menghasilkan kalus lembut. Lapisan daun keempat dan kelima merupakan lapisan-lapisan daun paling sesuai untuk membentuk kalus padat yang akan membentuk embrio somatik melalui proses embriogenesis somatik.

Jarak juga merupakan faktor yang dapat mempengaruhi pembentukan kalus embriogenik. Eksplan pada jarak 5 cm daripada apeks memberikan jumlah kalus padat yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan eksplan yang berhampiran dengan apeks (lebih banyak menghasilkan kalus lembut dan kalus tidak embriogenik).

Selain daripada dua faktor di atas, komposisi medium sewaktu pengkulturan juga memainkan peranan penting dalam pembentukan kalus embriogenik (Somers *et al.*, 1988). Menurut Evan *et al.* (1981), kehadiran pengawalatur iaitu auksin tertentu di dalam medium berupaya mempengaruhi pembentukan kalus embriogenik.

Kajian terhadap kopi yang telah dijalankan oleh Yasuda *et al.* (1985) menunjukkan bahawa penambahan NAA yang berkepekatan 9.31 mg/l ke dalam medium yang mengandungi 1.13 mg/l BA berupaya menghalang pembentukan kalus embriogenik. Kalus embriogenik terhasil pada kadar 80% daripada eksplan yang dikultur di atas medium yang berkomposisi 1.13 mg/l BA.

Armstrong & Green (1985) pula melaporkan bahawa ciri embriogenik yang terdapat pada kalus jagung dapat dikekalkan walaupun selepas satu tahun berada di dalam kultur. Kalus embriogenik jagung dapat diaruh pembentukannya di atas medium yang mengandungi L-prolina, sejenis asid amino.

2.1.5 Embriogenesis somatik

Embriogenesis somatik merupakan fenomena pembentukan embrio somatik daripada sel-sel somatik atau tisu-tisu yang tidak berorganisasi dan merupakan laluan morfogenetik utama untuk proses pertumbuhan semula tumbuhan (Guiderdoni & Demarly, 1988). Pembentukan embriogenesis somatik terjadi pada eksplan yang dikultur atau daripada kalus yang telah sedia terbentuk (Vajrabhaya, 1988).

Laporan pertama mengenai embriogenesis somatik telah dibuat oleh Steward *et al.* (1958) terhadap lobak merah. Menurut kajian tersebut, pembentukan pucuk awal lobak merah terjadi daripada embrio yang berbentuk torpedo pada agregat sel di dalam kultur ampaiian. Sel-sel embriogenik lobak merah dikenali melalui ciri-ciri khas sama seperti yang telah diperhatikan pada tebu iaitu sel-sel yang mempunyai sitoplasma yang berkepekatan tinggi, bergranul kanji besar dan kehadiran nukleus yang nyata (Vajrabhaya, 1988). Menurut Narayaneswary (1977), kajian terhadap embriogenesis somatik telah diperluaskan sehingga penghasilan embrio-embrio daripada kalus-kalus yang terbentuk di atas medium agar-agar. Perkembangan penyelidikan ini membuka peluang kepada pembentukan embrio melalui embriogenesis somatik yang tidak hanya tertumpu pada kultur ampaiian sahaja.

Komposisi medium amat mempengaruhi pembentukan embriogenesis somatik bagi tebu (Ahloowalia & Maretzki, 1983). Menurutnya, kepekatan sukrosa yang tinggi (30-60 g/l) dan penambahan 2,4-D ke dalam medium dapat mempengaruhi pertumbuhan kalus dan kejadian embriogenesis somatik.

Sekiranya kalus embriogenik berada di atas medium 2,4-D berkepekatan rendah untuk suatu tempoh masa yang panjang, embriogenesis somatik akan terbentuk. Walau bagaimanapun, pemerhatian yang bertentangan telah dilaporkan oleh Nadar *et al.* (1978) yang menyatakan bahawa proses pembezaan sel dan pembentukan sel embriogenik memerlukan kehadiran auksin (asid 2,4-D) pada kepekatan yang tinggi.

2.1.6 Variasi somaklon dan pertumbuhan semula

Variasi somaklon merupakan variasi yang terdapat atau diperhatikan pada tanaman yang mengalami proses pertumbuhan semula melalui sel atau tisu yang dikultur (Scowcroft & Larkin, 1982). Menurut den Bulk (1991), tanaman bervariasi yang terhasil daripada kerja-kerja kultur tisu dikenali sebagai somaklon sementara tanaman yang mempamerkan variasi dikenali sebagai telah mengalami variasi somaklon. Variasi ini terhasil akibat daripada perubahan genetik pada kalus semasa proses pengkulturan bagi penghasilan plantlet.

Sel tumbuhan yang ditumbuhkan di dalam kultur untuk suatu jangka masa tertentu berada dalam ketidakstabilan genetik dan selalunya tidak berupaya bagi proses pertumbuhan semula. Ketidakstabilan genetik selalu terjadi pada tanaman poliploidi seperti tebu, tomato dan tembakau (George & Sherrington, 1984). Ini menyebabkan terjadinya fenomena variasi dalam genotip dan fenotip tumbuhan tersebut apabila plantlet dihasilkan pada akhir kajian.

Tebu merupakan tanaman pertama yang mengalami variasi somaklon (Scowcroft & Larkin, 1982). Kajian-kajian lepas menunjukkan bahawa variasi somaklon pada tebu telah banyak dilaporkan oleh para penyelidik terdahulu (Ahloowalia & Maretzki, 1983; Heinz & Mee, 1969, 1971). Morfologi daun yang terhasil seperti bentuk, warna dan keadaan plantlet yang lebih subur sering dilihat pada tanaman yang mengalami variasi somaklon (Ahloowalia & Maretzki, 1983).

Variasi warna merangkumi albino, hijau pudar dan hijau tua manakala variasi daripada segi morfologi pula adalah seperti ciri-ciri daun yang berbentuk tajam di bahagian hujung, lebar, pendek dan tebal. Stafford (1991) telah mengkaji variasi somaklon pada tebu yang melibatkan ciri kerintangan terhadap virus penyakit Fiji dan kulapuk downi.

Jadual 2.1 menunjukkan senarai spesies tanaman yang telah diperhatikan mempunyai variasi somaklon pada tanaman yang ditumbuh semula daripada kultur tisu. Fenomena variasi somaklon juga telah diperhatikan pada tembakau (Scowcroft & Larkin, 1982) dan padi (Nishi *et al.* 1968). Variasi dapat diperhatikan pada tembakau daripada segi pengeluaran yang lebih tinggi, masa pembungaan, ketinggian pokok, bilangan daun, panjang dan lebar daun serta kandungan gula penurunan.

Jadual 2.1 : Spesies tanaman yang mengalami variasi somaklon

Spesies	Ciri-ciri variasi
Oat	ketinggian yang melebihi normal, daun berpintal
Barli	ketinggian tanaman, pembentukan pucuk, kesuburan
Sorgum	kesuburan, morfologi daun, corak tumbesaran
Bawang	saiz, bilangan daun, pembiakan
Nenas	warna daun, saiz dan lebar daun

Sumber : Scowcroft & Larkin (1982)

Pertumbuhan semula plantlet daripada famili Gramineae yang diperolehi melalui aruhan embriogenesis somatik yang pertama dilaporkan adalah pada *Bromus inermis* Leyss (Scowcroft & Larkin, 1982). Kejayaan embriogenesis somatik lain yang telah dilakukan terhadap beberapa tumbuhan *Graminaceous* sp. adalah seperti *Lolium* spp., *Lolium multiflorum* Lam., *Sorghum bicolor* (L.) dan *Panicum maximum* (Ahloowalia & Maretzki, 1983).

Fenomena pertumbuhan semula tebu dalam bidang kultur tisu bermula dengan organisasi tisu tebu yang digunakan sebagai eksplan (Ho & Vasil, 1983a). Kejayaan dalam pertumbuhan semula tebu telah dilaporkan (Liu, 1981), tetapi keupayaan morfogenetik pada tisu menurun selepas beberapa bulan berada di dalam kultur. Kehilangan keupayaan untuk menghasilkan pucuk telah menghalang penyelidikan susulan terhadap pembiakan tebu terutamanya dalam menjalankan pemilihan varian-varian di peringkat sel seterusnya menyekat usaha untuk menghasilkan tanaman transgenik.

Kajian oleh Chen *et al.* (1988) membuktikan bahawa tanaman daripada famili Gramineae berupaya menghasilkan tisu yang mempunyai perbezaan dalam tahap totipotensi masing-masing. Tahap totipotensi bergantung kepada genotip, eksplan yang digunakan dan medium yang dipilih untuk pembentukan kalus dan seterusnya plantlet.

Pucuk atau daun muda merupakan struktur eksplan pertama yang dihasilkan untuk membentuk embrio dan seterusnya plantlet. Struktur berbentuk globular dan skutela daun dengan trikoma adalah struktur pertama yang dihasilkan pada kalus sebelum membentuk embrio tebu yang lengkap (Chen *et al.*, 1988; Guiderdoni & Demarly, 1988).

2.2 PENYAKIT TEBU

Tebu terdedah kepada pelbagai penyakit yang boleh mempengaruhi pengeluaran dan akan merebak sekiranya tiada langkah berjaga-jaga diambil. Menurut Barnes (1974), terdapat empat agen utama penyebab jangkitan pada tebu. Di antaranya ialah bakteria, fungus, virus dan penyakit yang belum dipastikan agennya.

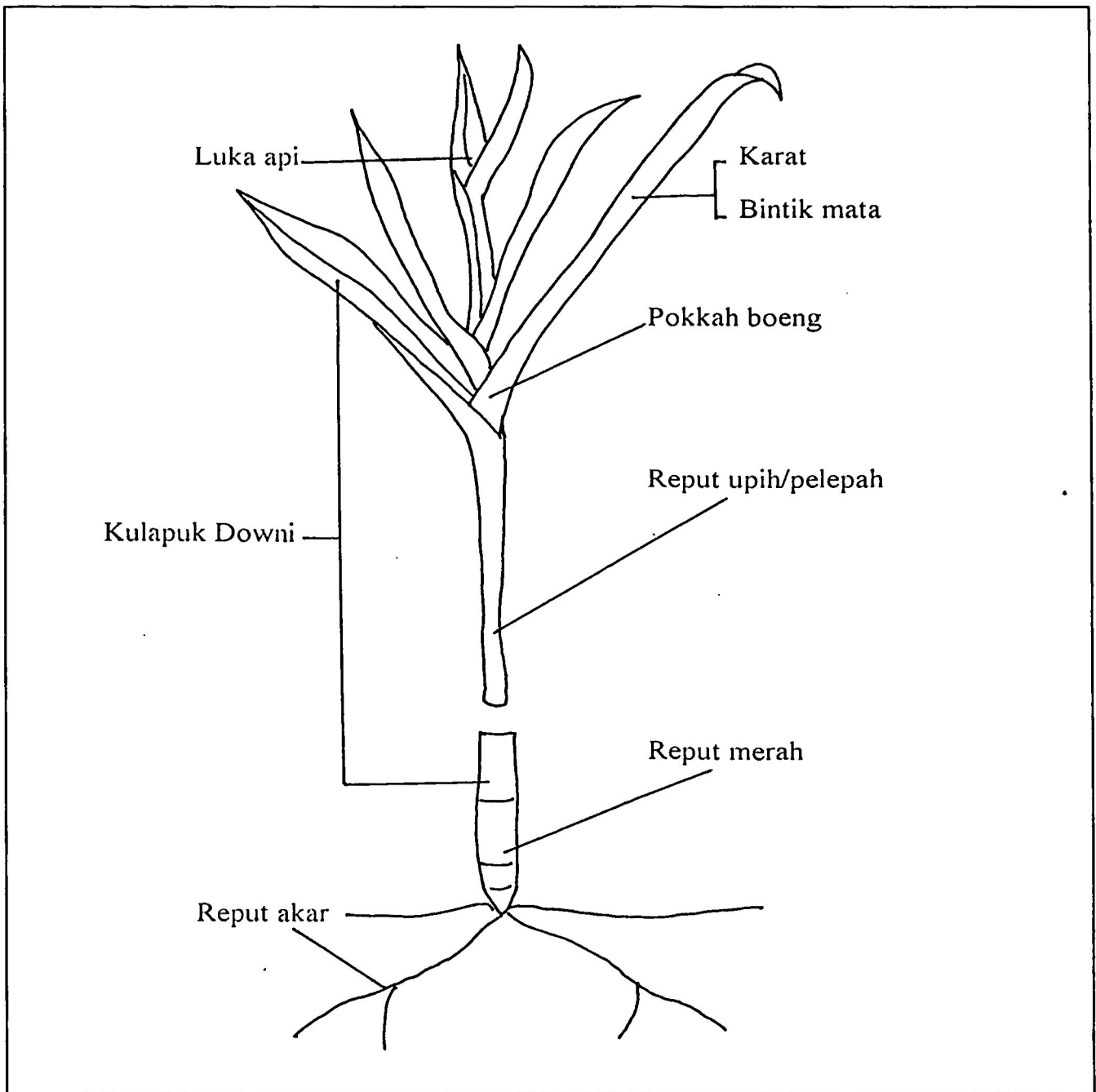
Kebanyakan penyakit yang terdapat pada tebu adalah disebabkan oleh jangkitan fungus (Blackburn, 1984). Menurut beliau, di antara penyakit-penyakit yang disebabkan oleh jangkitan fungus ialah kulapuk downi (*Perenosclerospora sacchari*), bintik mata (*Helminthosporium sacchari* Butler), reput upih (*Cytospora sacchari* Butler), 'Pokkah boeng' (*Fusarium moniliforme* Sheldon), reput merah (*Physalospora tucumanensis* Speg.), reput akar (*Pythium* spp.), luka api (*Ustilago scitaminea*) dan karat (*Puccinia kuehnii* Butler). Rajah 2.1 yang dipetik daripada Barnes (1974) menunjukkan bahagian-bahagian tebu yang sering dijangkiti oleh patogen yang merangkumi keseluruhan bahagian tanaman. Menurut beliau lagi, penyakit tanaman tebu yang paling serius adalah 'pokkah boeng'.

'Pokkah boeng' ialah penyakit yang disebabkan oleh fungus *Fusarium moniliforme* Sheldon (Blackburn, 1984). Penyakit ini telah dikesan pada hampir kesemua negara yang menanam tebu sebagai tanaman komersial (Tan, 1989).

Simptom-simptom bagi penyakit ini dapat diperhatikan pada daun muda yang berpintal dan berkedut, bentuk yang lebih tajam dan pendek jika dibandingkan dengan tanaman yang tidak dijangkiti.

Jangkitan penyakit 'pokkah boeng' oleh *F.moniliforme* berlaku melalui konidia-konidia yang terdapat di udara. Kawasan utama jangkitan *F.moniliforme* adalah di bahagian gelendung tebu yang masih bergulung. Konidia-konidia dipercayai berupaya

menjangkiti tebu kerana tisu daun pada peringkat ini masih muda dan belum mempunyai sistem perlindungan (tisu epidermis) yang kukuh.



Rajah 2.1 : Taburan kawasan jangkitan pada tebu yang disebabkan oleh fungus (Barnes, 1974).

2.3 PENYARINGAN PENYAKIT

Salah satu penggunaan kultur tisu adalah bagi tujuan pembaikbakaan tanaman. Menurut Daub (1984), terdapat tiga kaedah utama yang digunakan oleh para penyelidik dalam proses penyaringan penyakit.

Kaedah pertama ialah dengan penggunaan patogen atau toksin yang dihasilkan oleh patogen sebagai agen penyaringan untuk mewujudkan tanaman rintang. Toksin yang digunakan akan ditentukan terlebih dahulu sama ada bersifat spesifik pada perumah atau tidak spesifik. Kaedah ini sering digunakan kerana ia melibatkan kaedah penginokulatan *in vitro* terhadap perumah.

Patogen yang menghasilkan fitotoksin sering digunakan bagi pemilihan varieti rintang penyakit secara *in vitro* terhadap tanaman yang dikultur (Newsholme *et al.*, 1989). Kebanyakan kejayaan telah dicapai dengan menggunakan turasan kultur (Daub, 1984; Newsholme *et al.*, 1989) atau toksin yang belum dituliskan yang hanya bertujuan untuk melihat kesan tindakannya pada tisu perumah. Walau bagaimanapun, penggunaan toksin tulen akan lebih memudahkan proses penyaringan penyakit dan pemilihan varieti rintang.

Penggunaan patogen sebagai agen penyaringan bagi mendapatkan tanaman rintang tidak begitu digunakan secara meluas. Keadaan ini mungkin disebabkan oleh pendedahan tisu terhadap patogen yang tidak sekata. Melalui kaedah ini, hanya bahagian tisu yang tersentuh dan berhampiran dengan inokulum sahaja yang akan menunjukkan kesan jangkitan, sedangkan bahagian lain akan terbebas daripada jangkitan.

Keadaan ini berbeza dengan penggunaan toksin pada kultur ampaiian sel perumah yang mana telah diketahui bahawa ciri kultur ampaiian yang akan mendedahkan seluruh permukaan sel kepada patogen yang digunakan. Pendedahan ini akan berupaya untuk memberikan jangkitan patogen yang menyeluruh terhadap sel/tisu perumah.

Selain daripada itu, ciri rintang terhadap penyakit tidak akan terpamer semasa tisu masih berada di dalam kultur seandainya patogen digunakan sebagai agen penyaringan (Brettell & Ingram; 1979). Ini merupakan satu daripada keburukan yang dapat dilihat pada kaedah penginokulatan *in vitro* perumah dengan patogen.

Walau bagaimanapun, kaedah penginokulatan *in vitro* dengan menggunakan patogen sering digunakan oleh para penyelidik bagi tujuan mengkaji corak jangkitan patogen ke dalam tisu perumah dan bukannya bagi penghasilan varieti rintang kepada patogen. Kajian tentang corak penjangkitan patogen terhadap perumah telah banyak dijalankan oleh para penyelidik terdahulu (Mark & Mitchell, 1971; Pristou & Gallegly, 1954; Miller, 1949; Nik & Salleh, 1990, 1991; Nik, 1992a, 1992b).

Kaedah kedua yang digunakan ialah melalui pemindahan gen yang membawa ciri rintang tanaman terhadap sesuatu penyakit (Daub, 1984; Helgeson *et al.*, 1976). Gen-gen yang bertanggungjawab dalam mewujudkan ciri rintang pada sesuatu tanaman dipindahkan ke dalam tanaman yang resesif bagi mewujudkan ciri ini pada tanaman tersebut. Kaedah ini melibatkan penggunaan kultur protoplasma, pengasingan DNA, organel-organel dan kromosom.

Dalam kajian yang telah dijalankan oleh Helgeson *et al.* (1976), mereka mendapati bahawa ciri rintang yang dipunyai oleh sesuatu tanaman tembakau dapat diturunkan kepada generasi seterusnya. Keadaan ini telah dibuktikan dengan cara penghasilan kalus oleh varieti rintang dan resesif, di mana kedua-dua ciri ini telah diperhatikan pada kalus yang telah dihasilkan oleh kedua-dua tanaman ini.

Tanaman berciri rintang terhadap sesuatu penyakit juga boleh terhasil daripada kejadian variasi somaklon yang wujud pada tisu semasa menjalani pengkulturan. Variasi somaklon merupakan suatu keadaan yang diaruh atau wujud secara semulajadi pada tisu yang dikultur yang menyebabkan pembawaan ciri-ciri baru oleh plantlet yang terhasil. Kadangkala ciri-ciri yang dibawa atau dipamerkan itu merupakan suatu ciri kerintangan tanaman tersebut kepada sesuatu penyakit.

Variasi somaklon sangat penting dalam mewujudkan tanaman yang rintang penyakit (Newsholme *et al.*, 1989; Daub, 1984). Antara tanaman yang telah menunjukkan keadaan variasi somaklon setelah dikultur ialah tebu, kentang, tembakau, padi, jagung dan nenas (Daub, 1984).

Tebu merupakan tanaman terawal yang dikesan mengalami variasi somaklon (Daub, 1984; Scowcroft & Larkin, 1982). Di antara variasi yang dapat diperhatikan pada

tebu ialah daripada segi morfologi, sitogenetik dan ciri isozim (Scowcroft & Larkin, 1982). Kajian terhadap pembentukan kalus daripada tisu tebu oleh Heinz & Mee (1969) telah menunjukkan perubahan nyata daripada segi kerintangan plantlet yang terbentuk terhadap sesuatu patogen. Kajian-kajian seterusnya telah menunjukkan beberapa ciri rintang pada tebu, antaranya terhadap penyakit luka api yang disebabkan oleh *Ustilago scitaminae* (Fereol, 1984) dan penyakit bintik mata yang disebabkan oleh *Helminthosporium sacchari* (Larkin & Scowcroft, 1982).

2.4 PENGINOKULATAN *IN VITRO*

Kaedah penginokulatan *in vitro* telah lama dipraktikkan untuk mengkaji interaksi patogen-perumah (Ingram, 1980) dan kaedah ini berupaya memberi keputusan yang cepat dan nyata mengenai kesenjangkitan tanaman terhadap serangan patogen (Nik, 1992a,b). Kejayaan gabungan patogen-perumah telah dikenalpasti melalui kajian serangan parasit pada tanaman atau kultur tisu (Fereol, 1984). Salah satu kebaikan menggunakan kaedah penginokulatan *in vitro* dalam pembiakbakaan tanaman ialah pengwujudan variasi somaklon.

Variasi somaklon merupakan perkara penting dalam penghasilan germplasma yang rintang penyakit. Keupayaan ini telah diperhatikan dalam kebanyakan tanaman termasuk tebu (Daub, 1984). Jenis-jenis kultur seperti kalus, protoplasma, kultur haploid dan diploid serta meristem telah dikenalpasti sebagai penting dalam sesuatu kajian terhadap kerintangan penyakit. Variasi kerintangan terhadap penyakit jarang dipamerkan pada peringkat kalus (Ingram & Joachim, 1971) maka kajian yang sama terhadap keseluruhan tanaman telah dijalankan dan corak kajian sebegini didapati lebih bersesuaian.

Fereol (1984) pula berpendapat kaedah inokulasi *in vitro* mempunyai kebaikan yang lain seperti perjalanan kajian terhadap perumah-patogen dalam keadaan bebas daripada gangguan mikroorganisma lain; senang untuk memencilkan hasil daripada interaksi perumah-patogen yang telah dijalankan; dapat memberi laluan kepada kajian-kajian berbentuk 'phytopharmaceutic' dengan hanya melibatkan penggunaan bahan-bahan

hifa fungus *P. megasperma* bertukar ke warna perang selepas 3 hari penginokulatan. Sementara itu, tisu akar yang diinokulat telah mengalami nekrosis dan plasmolisis sel (Miller & Maxwell, 1984).

Penginokulatan *in vitro* juga telah dijalankan terhadap kentang dengan menggunakan ubi (Hohl & Stossel, 1976) dan tisu daun (Hohl & Suter, 1976) sebagai perumah. Kajian-kajian terhadap kentang melibatkan penggunaan *Phytophthora infestans* sebagai patogen. Kajian menunjukkan hifa patogen menjangkiti perumah melalui sel-sel ubi yang terluka (Hohl & Stossel, 1976) dan stomata (Hohl & Suter, 1976) setelah dua hari penginokulatan dijalankan.

Penginokulatan konidia *Fusarium oxysporum* pada plantlet kultur tisu asparagus telah menunjukkan simptom-simptom seperti nekrosis dan kerosakan tisu (Nik, 1992a). Bahagian batang asparagus yang terletak jauh daripada kawasan penginokulatan juga menunjukkan keadaan luka nekrotik apabila jalinan miselium ditanggalkan daripada batang yang dijangkiti (Nik *et al.*, 1993).

Kadar jangkitan fungus ke dalam tisu bergantung kepada umur tisu yang dijangkiti. Lapisan kutikel pada tisu merupakan satu lapisan pelindung kepada sebarang jangkitan. Perkara ini telah dibuktikan oleh Nik (1992a) melalui kajiannya yang menunjukkan bahawa jangkitan terjadi melalui lapisan kutikel asparagus oleh *F.oxysporum*.

Walau bagaimanapun, lapisan kutikel yang terdapat pada tisu muda adalah terlalu nipis. Nik dan Salleh (1990) melaporkan bahawa *F.proliferatum* berupaya menjangkiti tisu asparagus pada kawasan di antara sel epidermis di mana pembentukan lapisan kutikel belum terbentuk sepenuhnya. Kajian oleh Hohl & Suter (1976) pula menunjukkan yang hifa *P.infestan* juga menjangkiti tisu daun melalui epidermis dan pembentukan saluran hifa yang selari dengan permukaan daun telah diperhatikan pada bahagian bawah lapisan kutikel dan subkutikel.

Kajian yang sama telah dijalankan terhadap tebu (Fereol, 1984). Beliau menggunakan plantlet tebu yang terhasil daripada kultur tisu sebagai perumah dan *Ustilago scitamineae* sebagai patogen. Corak jangkitan patogen dikaji dan beliau