

**KAJIAN MORFOLOGI, KEPATOGENAN DAN
MOLEKULAR PENCILAN *FUSARIUM* DARIPADA
ORKID**

NURHAYATI BT MOHAMAD ZAIN

**UNIVERSITI SAINS MALAYSIA
2007**

PENGHARGAAN

Syukur alhamdulillah kepada Tuhan Yang Maha Esa, dengan izinNya maka saya dapat menyiapkan projek Ijazah Sarjana dan disertasi ini dengan lancar.

Ribuan ucapan terima kasih diucapkan kepada penyelia projek saya, iaitu Dr Latiffah Zakaria dan penyelia bersama Profesor Baharuddin Salleh kerana dengan bimbingan dan sokongan mereka telah banyak membantu saya untuk menyiapkan kajian dan disertasi ini dengan jayanya.

Terima kasih diucapkan kepada warga kakitangan Pusat Sains Kajihayat, terutama En Rahman , En. Kamaruddin dan Pn. Faridah serta rakan-rakan dari Makmal Penyelidikan 117 kerana banyak banyak memberi bantuan dan cadangan kepada saya sepanjang tempoh projek ini berjalan.

Akhir sekali ditujukan khas buat insan-insan tersayang, ayahanda Hj Mohamad Zain Othman, bonda Hj Asma Rani , suami Najmi Rahimi Muzni dan adik-adik , ribuan terima kasih kerana sentiasa bersama saya dalam susah dan senang untuk menyiapkan disertasi ini.

JADUAL KANDUNGAN

PENGHARGAAN	ii
JADUAL KANDUNGAN	iii
SENARAI JADUAL	vii
SENARAI GAMBARAJAH	ix
SENARAI PLAT	xi
SENARAI SINGKATAN	xiv
ABSTRAK	xvi
ABSTRACT	xvii
BAB 1 – PENGENALAN	1
BAB 2 - TINJAUAN BAHAN BACAAN	3
2.1 <i>Fusarium</i> secara am	3
2.2 Taksanomi <i>Fusarium</i>	5
2.3 Pencirian <i>Fusarium</i> secara morfologi	6
2.4 Ujian kepatogenan	7
2.5 Keserasian vegetatif	8
2.6 Pencirian Secara Molekular	10
2.6.1 Analisis Polimorfisma DNA Rawak Teramplikasi (RAPD)	11
2.6.2 Analisis Polimorfisma Panjang Jalur Terpotong (PCR-RFLP) Pada Kawasan ITS1+ 5.8S+ITS2	12
2.7 Orkid di Malaysia dan serangan <i>Fusarium</i> pada orkid	15
BAB 3 - BAHAN DAN KAEDAH	18
3.1 Kajian lapangan	18

3.2	Pemencilan dan penulenan kultur dari sampel dan penyediaan media	18
3.3	Penghasilan spora tunggal	20
3.4	Pencirian secara morfologi	20
3.5	Pengekalan pencilan	22
3.6	Ujian kepatogenan	22
	3.6.1 Ujian kepatogenan ke atas akar	22
	3.6.2 Ujian kepatogenan ke atas batang	24
	3.6.3 Analisis Data	25
3.7	Analisis VCG	26
	3.7.1 Penjanaan mutan <i>nit</i>	26
	3.7.2 Penjenisan fenotip	27
	3.7.3 Ujian berpasangan	27
3.8	Analisis Menggunakan Teknik Molekular	29
	3.8.1 Penyediaan miselium dan pengekstrakan DNA	29
	3.8.2 Polimorfisme DNA Rawak Teramplikasi (RAPD)	29
	3.8.3 Polimorfisme Panjang Jalur Terpotong (RFLP) pada kawasan ITS1-5.8S-ITS2	32
3.9	Analisis data	34
	BAB 4 - KEPUTUSAN	35
4.1	Pengumpulan sampel dan ciri-ciri morfologi <i>Fusarium</i>	35
	4.1.1 Persampelan di lapangan	35
	4.1.2 Pemerhatian di lapangan	35
	4.1.3 Morfologi dan kadar pertumbuhan	39
	4.1.3.1 Morfologi dan kadar pertumbuhan <i>F. proliferatum</i>	39

4.1.3.2	Morfologi dan kadar pertumbuhan <i>F. oxysporum</i>	42
4.1.3.3	Morfologi dan kadar pertumbuhan <i>F. solani</i>	44
4.2	Ujian kepatogenan	46
4.2.1	Ujian kepatogenan pada akar <i>Dendrobium</i>	46
4.2.2	Ujian kepatogenan pada batang <i>Dendrobium</i>	49
4.3	Analisis VCG	52
4.3.1	Penjanaan mutan <i>nit</i>	52
4.3.2	Penjenisan fenotip mutan rintang klorat (chlorate-resistant mutants)	53
4.3.3	Ujian berpasangan	54
4.4	Analisis Polimorfisme DNA Rawak Teramplifikasi (RAPD)	58
4.4.1	Pengskrinan pencetus	58
4.4.2	Pengoptimuman reagen PCR	59
4.4.2.1	Kepekatan templat DNA	59
4.4.2.2	Kepekatan MgCl ₂	60
4.4.2.3	Kepekatan dNTP	60
4.4.2.4	Kepekatan <i>Taq</i> polimerase	61
4.4.2.5	Kepekatan pencetus	62
4.4.3	Analisis RAPD <i>Fusarium oxysporum</i>	62
4.4.4	Analisis RAPD <i>Fusarium proliferatum</i>	65
4.4.5	Analisis RAPD <i>Fusarium solani</i>	68
4.4.6	Analisis matrik	70
4.4.7	Analisis Berkelompok UPGMA	71
4.5	Analisis Polimorfisma Panjang Jalur Terpotong (RFLP) Pada Kawasan ITS1+ 5.8S+ITS2	76
4.5.1	Amplifikasi DNA dengan pencetus ITS1 dan ITS4 pada kawasan ITS+ 5.8S+ITS2	76

4.5.2	Corak jalur pembatasan menggunakan <i>Eco881</i>	76
4.5.3	Corak jalur pembatasan menggunakan <i>BsuRI</i>	79
4.5.4	Corak jalur pembatasan menggunakan <i>Msp1</i>	81
4.5.5	Corak jalur pembatasan menggunakan <i>Eco R1</i>	83
4.5.6	Analisis matrik	84
4.5.7	Analisis berkelompok UPGMA	85
BAB 5 – PERBINCANGAN		89
5.1	Pengumpulan sampel dan ciri-ciri morfologi <i>Fusarium</i>	89
5.2	Ujian kepatogenan	90
5.3	Analisis VCG	93
5.4	Analisis Polimorfisma DNA Rawak Teramplifikasi (RAPD)	95
5.5	Analisis Polimorfisma Panjang Jalur Terpotong (PCR-RFLP) pada kawasan ITS1-5.8S+ITS2	97
BAB 6 - PERBINCANGAN AM		102
BAB 7 - KESIMPULAN DAN CADANGAN PENYELIDIKAN		104
SENARAI RUJUKAN		106
LAMPIRAN		
Lampiran 1		
Lampiran 2		
Lampiran 3		

SENARAI JADUAL

	Muka surat
Jadual 3.1	19
Data lokasi, bahagian dan genus orkid bagi pencilan yang dipencilkan di lapangan dan H.K Fusarium USM ^a	
Jadual 3.2	22
Pencilan yang digunakan untuk ujian kepatogenan ke atas akar	
Jadual 3.3	23
Skala jangkitan pada akar orkid yang dimodifikasi daripada Benyon <i>et. al.</i> (1996)	
Jadual 3.4	24
Pencilan yang digunakan untuk ujian kepatogenan ke atas batang	
Jadual 3.5	25
Skala jangkitan pada batang orkid (Benyon <i>et. al.</i> , 1996)	
Jadual 3.6	28
Analisis untuk pemerhatian VCG	
Jadual 3.7	28
Carta diagnosis	
Jadual 3.8	30
Kepekatan reagen untuk proses pengoptimuman	
Jadual 3.9	30
Pencetus yang dipilih untuk analisis RAPD	
Jadual 3.10	33
Enzim pembatasan yang digunakan untuk RFLP	
Jadual 4.1	36
Data lokasi persampelan, bahagian orkid, genus orkid dan spesies <i>Fusarium</i> yang diperolehi dari lapangan dan stok Himpunan Kultur <i>Fusarium</i> USM	
Jadual 4.2	37
Data spesies pencilan, genus dan bahagian orkid yang dijangkiti dan peratus pencilan dari lapangan.	
Jadual 4.3	37
Data spesies, bilangan dan lokasi persampelan bagi pencilan–pencilan dari stok Himpunan Kultur <i>Fusarium</i> USM.	
Jadual 4.4	48
Skala Jangkitan (DSI) ke atas akar <i>Dendrobium</i> yang diinokulasi dengan pencilan <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> dan <i>F. proliferatum</i> .	

Jadual 4.5	Skala Jangkitan (DSI) ke atas batang <i>Dendrobium</i> yang diinokulasi dengan pencilan <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> dan <i>F. proliferatum</i>	51
Jadual 4.6	Pencilan-pencilan <i>F. proliferatum</i> yang telah dikategorikan kepada kumpulan VCG	56
Jadual 4.7	Pencilan-pencilan <i>F. oxysporum</i> yang telah dikategorikan kepada kumpulan VCG	57
Jadual 4.8	Keputusan pengskrinan primer dari kit OPA	58
Jadual 4.9	Pengelompokan pencilan-pencilan <i>F. proliferatum</i> , <i>F. oxysporum</i> dan <i>F. solani</i> hasil analisis kluster UPGMA bagi analisis RAPD	75
Jadual 4.10	Anggaran saiz jalur pembatasan pencilan-pencilan <i>Fusarium</i> dari orkid menggunakan enzim pembatasan <i>Eco881</i> , <i>Msp1</i> , <i>BsuRI</i> dan <i>EcoR1</i>	77
Jadual 4.11	Pengelompokan pencilan-pencilan <i>F. proliferatum</i> , <i>F. oxysporum</i> dan <i>F. solani</i> hasil analisis kluster UPGMA bagi analisis PCR-RFLP kawasan ITS1+ 5.8S+ITS2.	88

SENARAI GAMBARAJAH

		Muka surat
Gambarajah 2.1	Kawasan-kawasan pada rDNA	12
Gambarajah 3.1	Ujian berpasangan di atas medium minimal antara pencilan 1378 dan 1381	28
Gambarajah 4.1	Corak jalur RAPD pencilan <i>F. oxysporum</i> menggunakan primer OPA2	64
Gambarajah 4.2	Corak jalur RAPD pencilan <i>F. oxysporum</i> menggunakan primer OPA4	64
Gambarajah 4.3	Corak jalur RAPD pencilan <i>F. oxysporum</i> menggunakan primer OPA10	65
Gambarajah 4.4	Corak jalur RAPD <i>F. proliferatum</i> menggunakan primer OPA2.	67
Gambarajah 4.5	Corak jalur RAPD <i>F. proliferatum</i> menggunakan primer OPA4	67
Gambarajah 4.6	Corak jalur RAPD <i>F. proliferatum</i> menggunakan primer OPA10	67
Gambarajah 4.7	Corak jalur RAPD <i>F. solani</i> menggunakan dengan primer OPA2.	69
Gambarajah 4.8	Corak jalur RAPD <i>F. solani</i> menggunakan dengan primer OPA4.	69
Gambarajah 4.9	Corak jalur RAPD <i>F. solani</i> menggunakan dengan primer OPA10.	69
Gambarajah 4.10	Dendrogram daripada analisis UPGMA berdasarkan jalur RAPD yang dihasilkan oleh pencilan-pencilan <i>F. proliferatum</i> , <i>F. solani</i> dan <i>F. oxysporum</i> yang dipencilkan dari akar, batang orkid dan pencilan dari stok	74

Gambarajah 4.11	Corak jalur pembatasan <i>F.oxysporum</i> menggunakan <i>Eco881</i>	78
Gambarajah 4.12	Corak jalur pembatasan <i>F.proliferatum</i> menggunakan <i>Eco881</i>	78
Gambarajah 4.13	Corak jalur pembatasan <i>F.solani</i> menggunakan <i>Eco881</i>	79
Gambarajah 4.14	Corak jalur pembatasan <i>F.oxysporum</i> menggunakan <i>BsuRI</i>	80
Gambarajah 4.15	Corak jalur pembatasan <i>F. proliferatum</i> menggunakan <i>BsuRI</i> .	80
Gambarajah 4.16	Corak jalur pembatasan <i>F. solani</i> menggunakan <i>BsuRI</i>	81
Gambarajah 4.17	Corak jalur pembatasan <i>F. oxysporum</i> menggunakan <i>MspI</i>	82
Gambarajah 4.18	Corak jalur pembatasan <i>F. proliferatum</i> menggunakan <i>Msp1</i> .	82
Gambarajah 4.19	Corak jalur pembatasan <i>F. solani</i> menggunakan <i>Msp1</i>	82
Gambarajah 4.20	Corak jalur pembatasan <i>F.oxysporum</i> menggunakan <i>EcoRI</i> .	83
Gambarajah 4.21	Corak jalur pembatasan <i>F. proliferatum</i> menggunakan <i>EcoRI</i>	83
Gambarajah 4.22	Corak jalur pembatasan <i>F. solani</i> menggunakan <i>EcoRI</i>	84
Gambarajah 4.23	Dendrogram hasil daripada analisis UPGMA berdasarkan jalur pembatasan PCR-RFLP kawasan ITS1+5.8S+ITS2 pencilan-pencilan <i>F. proliferatum</i> , <i>F. solani</i> dan <i>F. oxysporum</i> yang dipencilkan dari akar, batang orkid dan stok kultur.	87

SENARAI PLAT

	Muka surat
Plat 4.1 Gejala reput akar yang bermula pada bahagian hujung akar <i>Dendrobium</i> yang diperhatikan di lapangan.	38
Plat 4.2 Fialid yang terbentuk pada <i>F. proliferatum</i>	41
Plat 4.3 Makrokonidia dan mikrokonidia <i>F. proliferatum</i>	41
Plat 4.4 Pigmentasi pencilan AP11 pada medium PDA pada hari ke 7 (Pandangan permukaan bawah piring petri)	41
Plat 4.5 Pigmentasi pencilan AP11 pada medium PDA pada hari ke 20 (Pandangan permukaan bawah piring petri)	41
Plat 4.6 Miselium pencilan AP11 (Permukaan atas piring petri)	41
Plat 4.7 Miselium pencilan 1381 (Permukaan atas piring petri)	41
Plat 4.8 Makrokonidia dan mikrokonidia <i>F. oxysporum</i>	43
Plat 4.9 Monofialid pada kultur <i>F. oxysporum</i>	43
Plat 4.10 Klamidospora pada kultur <i>F. oxysporum</i>	43
Plat 4.11 Miselium yang terbentuk di atas PDA bagi pencilan <i>F.oxysporum</i> (pandangan bahagian atas piring petri)	43
Plat 4.12 Pigmentasi pencilan <i>F. oxysporum</i> pada agar (pandangan bahagian bawah piring petri)	43
Plat 4.13 Pigmentasi pencilan <i>F. oxysporum</i> pada agar (pandangan bahagian bawah piring petri)	43
Plat 4.14 Makrokonidia <i>F. solani</i>	45
Plat 4.15 Fialid <i>F. solani</i>	45
Plat 4.16 Pembentukan klamidospora <i>F. solani</i>	45

Plat 4.17	Miselium <i>F. solani</i> yang terbentuk di atas PDA (pandangan di bahagian atas piring petri)	45
Plat 4.18	Miselium <i>F. solani</i> yang terbentuk di atas PDA (pandangan di bahagian atas piring petri)	45
Plat 4.19	Pigmentasi <i>F. solani</i> pada agar (pandangan di bahagian bawah piring petri)	45
Plat 4.20	Akar sihat tanpa jangkitan menunjukkan warna kehijauan	47
Plat 4.21	Gejala pada akar <i>Dendrobium</i> pada hari ke 20	47
Plat 4.22	Gejala pada akar <i>Dendrobium</i> pada hari ke 40	47
Plat 4.23	Batang orkid <i>Dendrobium</i> yang sihat tanpa jangkitan	50
Plat 4.24	Batang kelihatan berair dan bertukar warna kekuningan	50
Plat 4.25	Jangkitan pada daun di mana daun kelihatan perang berair dan mereput	50
Plat 4.26	Bahagian daun yang tidak dijangkiti dan bahagian yang dijangkiti	50
Plat 4.27	Pembentukan sektor nipis dan lutsinar di atas MMC	53
Plat 4.28	Pencilan <i>F. solani</i> tidak membentuk sektor walaupun pada kepekatan klorat yang tinggi	53
Plat 4.29	Pembentukan heterokarion yang jelas apabila <i>nit1</i> dan NitM pencilan yang sama dipasangkan	55
Plat 4.30	Pembentukan heterokarion apabila <i>nit1</i> dan NitM pencilan yang berlainan dipasangkan	55
Plat 4.31	Pengoptimuman kepekatan templat DNA. Corak jalur RAPD hasil amplifikasi dengan kepekatan templat DNA berbeza	59

Plat 4.32	Pengoptimuman kepekatan $MgCl_2$: Corak jalur RAPD hasil amplifikasi dengan primer OPA4 menggunakan kepekatan $MgCl_2$ berbeza	60
Plat 4.33	Pengoptimuman kepekatan dNTP: Corak jalur RAPD hasil amplifikasi dengan primer OPA4 menggunakan kepekatan dNTP berbeza	61
Plat 4.34	Pengoptimuman kepekatan <i>Taq</i> polimerase: Corak jalur RAPD hasil amplifikasi dengan primer OPA4 menggunakan kepekatan <i>Taq</i> polimerase berbeza	61
Plat 4.35	Pengoptimuman kepekatan primer. Corak jalur RAPD hasil amplifikasi dengan kepekatan primer berbeza	62
Plat 4.36	Saiz jalur ITS1+5.8S+ITS2 <i>Fusarium</i> yang diamplifikasi dengan pencetus ITS1 dan ITS4	76

SENARAI SINGKATAN

µg	microgram
µm	mikromolar
ANOVA	Analisis Varians Satu Hala
CRD	Complete Randomized Design (Rekabentuk Rawak Lengkap)
CRUN	Chlorate resistant nitrate utilizing
DMRT	Duncan's Multiple Range Test
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
g	gram
H.K <i>Fusarium</i> , USM	Himpunan Kultur <i>Fusarium</i> , Universiti Sains Malaysia
HSI	heterokaryon self-incompatibility
HX	Hypoxanthine
ITS	Internal Transcribed Spacer
KCIA	Agar Kalium Klorida
kb	kilobase pairs
Kb	Kilobes
Kg	Kilogram
L	Liter
M	molar
mA	miliampere
min	minit
ml	mililiter
MM	Medium Minimal
mM	milimolar
MMC	Agar Minimal Klorat
ng	nanogram
NH ₄	media Ammonium
NO ₂	media nitrit
NO ₃	media nitrat
NTSYS-pc	Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System
OPA	Operon Technologies Primer Series A
PCR	Tindakbalas Berantai Polimerase
PDA	Agar Kentang Dektrosa
PDC	Agar Dektrosa Klorat
PPA	Agar Peptone PCNB
PSA	Agar Kentang Sukrosa
CLA	Agar Cebisan Daun Carnation
RAPD	Polimorfisma DNA Rawak Teramplifikasi
RFLP	Polimorfisme Panjang Jalur Terpotong
rpm	pusingan per min
SA	Agar Tanah
SMC	Simple Matching Coefficient
SNA	Agar Spezieller Nährstoffarmer
spp.	spesies

SPSS	Statistical Package for Social Science
TBE	Tris-Borate-EDTA
TE	Tris-EDTA
U	unit
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages
VCG	Kumpulan Keserasian Vegetatif

KAJIAN MORFOLOGI, KEPATOGENAN DAN MOLEKULAR PENCILAN *FUSARIUM* DARIPADA ORKID

ABSTRAK

Sebanyak 32 pencilan *Fusarium* telah dipencilkan dari orkid *Dendrobium* (29 pencilan) dan *Oncidium* (3 pencilan) yang menunjukkan gejala reput akar dan reput batang. Lapan pencilan *Fusarium* yang dipencilkan dari orkid juga turut diperolehi dari Himpunan Kultur *Fusarium* USM. Melalui ciri-ciri morfologi, pencilan-pencilan yang diperolehi dikenalpasti sebagai *F. oxysporum*, *F. proliferatum* dan *F. solani*. Ujian kepatogenan terhadap pencilan *F. oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. solani* dilakukan dengan menggunakan *Dendrobium* sebagai perumah dan keputusan menunjukkan ketiga-tiga spesies tersebut bersifat patogenik pada *Dendrobium*. Bagi kajian VCG, mutan *nit* telah diperolehi dari semua pencilan *F. proliferatum* dan *F. oxysporum* menggunakan medium dengan kepekatan klorat maksimum 2.5%. Tiada mutan *nit* dihasilkan oleh *F. solani*. Empat kumpulan VCG telah diperolehi daripada *F. proliferatum* dan lima kumpulan VCG pula dari *F. oxysporum*. Bagi kajian molekular menggunakan teknik RAPD dan PCR-RFLP kawasan ITS1-5.8S-ITS2, corak jalur yang dihasilkan dapat membezakan ketiga-tiga spesies *Fusarium* yang menyebabkan reput akar dan batang orkid *Dendrobium* dan *Oncidium*. Berdasarkan kluster UPGMA, ketiga-tiga spesies dikelompokkan dalam kelompok yang berasingan. Oleh itu, hasil kajian mendapati ciri-ciri morfologi dan teknik molekular RAPD dan PCR-RFLP kawasan ITS1-5.8S-ITS2 dapat digunakan untuk mencirikan spesies-spesies *Fusarium* yang dipencilkan dari orkid *Dendrobium* dan *Oncidium*.

MORPHOLOGICAL, PATHOGENICITY AND MOLECULAR STUDIES OF *FUSARIUM* ISOLATES FROM ORCHIDS

ABSTRACT

A total of 32 *Fusarium* spp were isolated from *Dendrobium* (29 isolates) and *Oncidium* (3 isolates) showing symptoms of root and stem rot. Another eight isolates were obtained from *Fusarium* stock cultures of USM. Based on morphological characteristics, the isolates were identified as *F. oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. solani*. Pathogenicity tests against *F. oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. solani* were conducted on healthy *Dendrobium* and the results showed that the three *Fusarium* were pathogenic to *Dendrobium*. In VCG analysis, nitrate-nonutilizing mutants were generated from all *F. proliferatum* and *F. oxysporum* isolates on a medium amended with maximum 2.5% KClO₃. *Nit* mutant was not generated by *F. solani*. Four and five vegetative compatibility groups were identified from *F. proliferatum* and *F. oxysporum*, respectively. For molecular analysis using RAPD and PCR-RFLP of ITS1-5.8S-ITS2 regions, banding patterns generated were able to distinguish all the three species causing root and stem rot on *Dendrobium* and *Oncidium*. Based on UPGMA cluster analysis, all the three species were clustered in a different clusters. Therefore, the present study showed that morphological characteristics and molecular techniques of RAPD and PCR-RFLP of ITS1-5.8S-ITS2 can be used to characterize *Fusarium* species from *Dendrobium* and *Oncidium* orchids.

BAB 1 PENGENALAN

Orkid merupakan tanaman hiasan yang ditanam sebagai hobi mahupun untuk pasaran tempatan dan luar negara. Polisi Pertanian Nasional (1992-2010) telah mengenalpasti tanaman hiasan sebagai salah satu tanaman yang mempunyai potensi untuk dimajukan. Di antara tanaman hiasan yang penting yang ditanam adalah orkid dan kawasan penanaman orkid utama terletak di negeri Johor dan Perak. Orkid *Dendrobium* merupakan genus orkid yang paling popular ditanam diikuti oleh *Aranda*, *Oncidium* dan *Mokara* (Mohd Rejab, 1999).

Antara masalah yang timbul dalam penanaman orkid adalah tumbuhan ini mudah terdedah kepada serangan penyakit sama ada berpunca dari mikroorganisma dan juga serangga perosak. Serangan penyakit ini menyebabkan pengurangan hasil dan mutu bunga serta pertumbuhan pokok keseluruhannya. Di antara mikroorganisma yang menyebabkan penyakit pada tanaman orkid adalah kulat. Kulat patogenik yang telah dilaporkan boleh menyebabkan jangkitan penyakit pada orkid adalah *Cercospora sp.*, *Alternaria sp.*, *Phyllosticta sp.*, *Helminthosporium sp.* (Hassan dan Zainol, 1991) dan *Fusarium sp.* (Singh, 1981; Salleh *et al.*, 1997).

1.1 Objektif kajian

Kulat *Fusarium* telah dilaporkan menyebabkan penyakit reput akar dan batang orkid. Walau bagaimanapun tiada data yang lengkap mengenai spesies-spesies *Fusarium* yang menyebabkan kedua-dua penyakit tersebut. Oleh itu objektif kajian yang dijalankan adalah :

- 1) Memencil dan mengenalpasti spesies *Fusarium* yang menyebabkan penyakit reput akar dan batang orkid *Dendrobium* dan *Oncidium* berdasarkan ciri-ciri morfologi .
- 2) Menjalankan ujian kepatogenan terhadap setiap spesies *Fusarium* yang berjaya dipencilkan untuk memastikan spesies tersebut adalah patogen sebenar yang menyebabkan reput akar dan batang orkid.
- 3) Mengkaji diversiti genetik spesies *Fusarium* yang berjaya dipencilkan melalui analisis Kumpulan Keserasian Vegetatif (VCG).
- 4) Melakukan analisis molekular menggunakan teknik analisis Polimorfisma DNA Rawak Teramplifikasi (RAPD) dan analisis Polimorfisma Panjang Jalur Terpotong (PCR-RFLP) pada kawasan ITS1-5.8S-ITS2 untuk mengetahui hubungan genetik inter dan intraspesifik setiap pencilan *Fusarium* yang dipencilkan.

BAB 2 TINJAUAN BAHAN BACAAN

2.1 *Fusarium* secara umum

Fusarium adalah sejenis kulat berfilamen dari filum Ascomycota yang boleh didapati pada udara, air, biji benih, tumbuhan dan tanah. Genus *Fusarium* terdiri dari spesies-spesies yang mempunyai kevariabelan yang tinggi. Ini berpunca dari struktur genetik dan morfologi yang senang berubah mengikut keadaan persekitaran.

Spesies *Fusarium* ada yang bersifat patogenik dan ada yang hidup sebagai saprofit. Spesies *Fusarium* yang bersifat patogenik pernah dilaporkan menyerang manusia, haiwan dan tumbuhan. Antaranya ialah jangkitan onychomikosis dan keratomikosis (Nelson *et al.*, 1994) dan keratitis (Godoy *et al.*, 2004) pada manusia. Dari data jangkitan kulat atau mikosis di Amerika Syarikat menunjukkan 93.3% kulat yang dipencilkan dari pesakit merupakan pelbagai spesies *Fusarium* (Salleh, 1997). Spesies *F. solani*, *F. oxysporum* dan *F. moniliforme* juga dilaporkan sebagai tiga spesies yang paling banyak menyebabkan jangkitan penyakit pada manusia (Salleh dan Strange, 1988). Pada haiwan pula, *Fusarium* didapati sebagai punca utama menyebabkan penyakit keratitis (Mitchell dan Attleberger 1973).

Di kawasan tropika, serangan *Fusarium* pada tumbuhan yang pernah dilaporkan ialah penyakit layu Panama pada pisang oleh *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*; malformasi pada pokok mangga, *F. manginifera*; busuk batang vanilla, *F. oxysporum* (Summerell *et al.*, 2003), penyakit bakanae pada padi, *F.*

moniliforme; kelayuan pada kelapa sawit, *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis* dan pokkah boeng pada tebu oleh *F. moniliforme* dan *F. moniliforme* var. *subglutinans* (Salleh, 1997). Walau bagaimanapun, kehadiran *Fusarium* pada sesuatu tumbuhan berpenyakit tidak bermakna ia adalah patogen yang menyebabkan penyakit tersebut. Ia mungkin hanya sebagai pengkoloni sekunder atau saprofit. Di antara spesies *Fusarium* yang kerap ditemui sebagai saprofit pada bahagian tumbuhan yang berpenyakit ialah *F. acuminatum*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum* dan *F. solani* pada akar dan batang; *F. proliferatum* dan *F. semitectum* pada daun serta *F. poae* dan *F. semitectum* pada biji benih dan bijirin (Summerell *et al.*, 2003). Selain itu, ada juga strain *Fusarium* yang pernah direkodkan sebagai patogen pendam seperti *F. moniliforme* yang menyebabkan penyakit kronik pada pokok jagung dan pada masa yang sama dapat juga dipencilkan dari pokok jagung yang sihat (Leslie *et al.*, 1990).

Kajian secara fisiologi membuktikan beberapa spesies *Fusarium* menghasilkan mikotoksin (fusariotoksin) yang merupakan hasil metabolit sekundernya. Fusariotoksin ini bukan saja menyebabkan kerosakan pada tanaman malah boleh menyebabkan keracunan kepada manusia dan haiwan. Kesan-kesan keracunan banyak dilaporkan di seluruh dunia tetapi kurang dilaporkan di kawasan tropika termasuk Malaysia (Salleh, 1997). Antara spesies *Fusarium* yang menghasilkan fusariotoksin ialah *F. sporotrichioides* dan *F. poae* yang menghasilkan trikotesen, *F. graminearum* menghasilkan zearanelon dan *F. moniliforme* yang menghasilkan fumonisin (Salleh, 1997).

2.1 Taksanomi *Fusarium*

Pada peringkat awal *Fusarium* dikenali dengan ciri istimewanya iaitu mempunyai konidium yang bersaiz besar (makrokonidium) berbentuk bulan sabit (fusiform) dan mempunyai sel pangkal seakan-akan tumit yang dinamakan sel kaki (Salleh, 1997). Sistem taksonomi asalnya telah mengklasifikasikan setiap spesies berdasarkan persamaan ciri-ciri yang wujud ke dalam kumpulan atau seksyen. Pengelasan ini mula diperkenalkan oleh Wollenweber dan Reinking pada tahun 1935. Berikutan dengan kemunculan monograf itu, menyusul pula beberapa sistem taksonomi dan pengelasan *Fusarium* oleh ahli taksonomi kerana monograf ini sukar difahami (Salleh, 1997). Sistem Booth (1971) didapati lebih kerap digunakan sehingga ke hari ini kerana ia menitikberatkan ontogoni konidium dan penggunaan medium dan faktor pengeraman yang seragam untuk pengecaman spesies. Taksonomi *Fusarium* dari kawasan tropika pula hanya mula dikaji dengan mendalam oleh Gordon pada tahun 1960 (Salleh, 1997).

Bagi satu spesies *Fusarium* ia turut mempunyai beberapa forma specialis atau bentuk khas. Forma specialis merupakan strain-strain fisiologi yang tidak dapat dibezakan dari strain saprofit pada spesies yang sama tetapi menunjukkan ciri-ciri fisiologi yang berbeza dari segi kebolehan untuk memparasitkan perumah yang khusus (Booth, 1971).

Sistem taksonomi klasik adalah berdasarkan ciri-ciri morfologi dan ia amat sukar dibezakan kerana memerlukan kepakaran dan pengalaman. Bagi beberapa spesies seperti *F. oxysporum*, ia mempunyai variasi genetik yang

amat luas menyebabkan pencirian secara morfologi sahaja adalah sukar (Booth, 1971).

2.3 Pencirian *Fusarium* secara morfologi

Pencirian secara morfologi merupakan teknik asas pencirian dan taksonomi *Fusarium*. Sebelum dicirikan, *Fusarium* perlu dikultur secara spora tunggal untuk mengelakkan kultur campuran yang akan mengelirukan pemerhatian. Adalah menjadi satu perkara biasa di mana lebih dari satu spesies *Fusarium* dapat dipencilkan dari satu tisu tumbuhan yang dijangkiti (Summerell *et al.*, 2003). Kriteria utama dalam proses pencirian ialah bentuk dan saiz makrokonidia. Walau bagaimanapun makrokonidia ini haruslah diperolehi dari sporodokia *Fusarium* yang di kultur di atas Agar Cebisan Daun Teluki (CLA). *Fusarium* yang ditumbuhkan di atas medium seperti Agar Kentang Dektrosa (PDA) atau Agar Kentang Sukrosa (PSA) akan menghasilkan bentuk makrokonidia yang mempunyai kevariabelan yang tinggi dan ini mengelirukan proses pencirian (Burgess *et al.*, 1994). Kriteria lain ialah kehadiran mikrokonidia, bentuk, saiz dan pembentukan mikrokonidia (berantai atau kepala palsu), kehadiran klamidospora dan sifat sel konidiogenus yang memegang mikrokonidia (kepanjangan, bersifat monofialid atau polifialid atau gabungan keduanya). Untuk mendapatkan pemerhatian yang lebih jelas tentang kriteria-kriteria ini beberapa medium pertumbuhan didapati dapat membantu seperti Agar Kalium Klorida (KCIA) yang meningkatkan bilangan dan kepanjangan rantai mikrokonidia pada kultur supaya lebih mudah dilihat (Burgess *et al.*, 1994) dan Agar Tanah (SA) yang membantu dalam pembentukan klamidospora dengan lebih jelas dan cepat (Klotz *et al.*, 1988). Ini amat berguna dalam

pencirian beberapa spesies *Fusarium* seperti *F. acuminatum*, *F. nygamai* dan *F. beomiforme* yang mana pembentukan klamidospora pada CLA adalah terlalu lambat dan perlahan (Burgess *et al.*, 1994).

Kriteria-kriteria sekunder dalam pencirian spesies *Fusarium* ialah morfologi koloni, pembentukan pigmen pada hifa dan permukaan agar dan diameter koloni selepas pengeraman selama 3 hari pada suhu 25°C dan 30°C. Ciri-ciri ini dilihat pada *Fusarium* yang ditumbuhkan pada medium PDA. Walau bagaimanapun pencirian ini mungkin sukar dan mengelirukan terutama jika kultur mengalami proses degenerasi kerana ia akan menyebabkan kadar pertumbuhan *Fusarium* berubah secara drastik (Burgess *et al.*, 1994).

2.4 Ujian kepatogenan

Ujian kepatogenan amat penting dalam membuktikan sesuatu spesies *Fusarium* itu hadir pada tumbuhan perumah sebagai patogen atau hanya sebagai saprofit. Ini kerana terdapat juga spesies *Fusarium* yang hanya hadir sebagai pengkoloni sekunder atau saprofit pada sesuatu bahagian tumbuhan yang menunjukkan gejala penyakit.

Postulat Koch adalah teknik yang diperkenalkan oleh Robert Koch pada tahun 1876 dan digunakan untuk membuktikan sama ada sesuatu spesies mikroorganisma yang dipencilkan bersifat patogen atau sebaliknya. Ujian perlu dilakukan dengan teliti dan mungkin diulang bagi membuktikan kesahihan keputusan sebelum mengesahkan sesuatu mikroorganisma itu sebagai patogen.

Beberapa peraturan dan kaedah perlu dipatuhi untuk memastikan keberkesanan dan ketepatan ujian. Kulat yang diperolehi dari tumbuhan berpenyakit perlu dikulturkan pada tumbuhan yang sihat dari varieti atau spesies yang sama dengan tumbuhan perumah asal. Keadaan persekitaran juga harus sama dengan persekitaran di mana perumah asal tumbuh. Terdapat juga spesies kulat yang hanya bersifat patogenik pada tumbuhan perumah apabila dikenakan tekanan oleh persekitaran dan oleh itu ujian kepatogenan yang dirancang perlu memberikan aplikasi tekanan persekitaran yang sama. Tekanan persekitaran ini mungkin disebabkan oleh faktor-faktor seperti kelembapan tanah yang tidak mencukupi, suhu yang ekstrim atau penggunaan herbisid (Burgess *et al.*, 1994). Akhirnya, kulat yang sama dengan kulat yang diinokulasi pada tumbuhan itu harus diperolehi untuk melengkapkan pembuktian ini (Dickinson dan Lucas, 1982).

2.5 Keserasian vegetatif

Bagi beberapa jenis kulat, ketidakhadiran kitar seksual berkemungkinan digantikan oleh proses-proses lain bagi memastikan berlakunya pertukaran genetik dan pembentukan diversiti (Kistler *et al.*, 1998). Salah satu proses yang telah diambil kira ialah keserasian vegetatif atau juga dikenali sebagai keserasian heterokarion yang melibatkan percantuman hifa dua jenis strain dari spesies yang sama dan membentuk heterokarion. Strain-strain yang dapat membentuk heterokarion dikatakan serasi secara vegetatif dan dikategorikan dalam Kumpulan Keserasian Vegetatif (VCG) yang sama dan sebaliknya bagi strain-strain yang tidak membentuk heterokarion antara satu sama lain.

Strain-strain serasi secara vegetatif jika alel-alel pada semua lokus yang mengawal keserasian vegetatif adalah sama. Oleh itu VCG boleh dikatakan cara fenotip untuk membahagi dan mengkategorikan populasi bagi spesies *Fusarium* (Correll *et al.*, 1987). Proses analisis VCG bermula dengan penjaan mutan menggunakan medium klorat yang merupakan analog toksid bagi nitrat pada kepekatan tertentu dan mutan dikatakan terjana apabila sektor resistan klorat terbentuk (Correll *et al.*, 1987). Sektor yang tumbuh secara nipis tetapi tersebar dengan luas di atas medium dan diandaikan sebagai mutan *nit* (Jacobson dan Gordon, 1988). Mutan-mutan *nit* kemudian dibezakan jenisnya berdasarkan pertumbuhan pada pelbagai medium yang mengandungi sumber nitrogen tunggal setiap satunya. Setelah mutan dikenalpasti ia akan dipasangkan di atas medium yang mengandungi nitrat sebagai sumber nitrogen tunggal dan strain-strain yang serasi secara vegetatif akan membentuk heterokarion antara satu sama lain. Pada peringkat pertama pemasangan dilakukan dengan memasangkan dua jenis mutan *nit* dari pencilan yang sama. Jika pada peringkat ini heterokarion tidak terbentuk, strain dikatakan ketidakserasian heterokarion (heterokaryon self-incompatibility) dan tidak akan digunakan untuk pemasangan seterusnya. Pemasangan seterusnya melibatkan dua mutan *nit* dari pencilan yang berlainan.

Puhalla (1985) telah memperkenalkan sistem penomboran bagi VCG dan juga teknik yang membolehkan pelbagai strain *F. oxysporum* dicirikan berdasarkan teknik VCG. Kajiannya ini telah memberi laluan kepada pengkaji-pengkaji lain untuk membangunkan kaedah dan teknik ini bagi mengklasifikasikan *F. oxysporum* (Kistler *et al.*, 1998). Selain itu kaedah VCG juga merupakan teknik

yang kerap digunakan untuk membezakan ras dan formae speciales (Katan, 1999). Ia dikatakan lebih cepat berbanding teknik untuk membezakan ras yang melibatkan ujian inokulasi pada kultivar yang berbeza (Aloi dan Baayen, 1993).

2.6 Pencirian Secara Molekular

Pengecaman spesies *Fusarium* secara morfologi adakalanya sukar dan mengelirukan. Ini kerana sifatnya yang mudah berubah mengikut medium pengkulturan dan faktor-faktor persekitaran yang lain. Oleh itu kaedah biologi molekul menggunakan penanda DNA digunakan untuk membantu mendapatkan identiti *Fusarium* dengan lebih tepat terutama bagi spesies yang sukar dibezakan secara morfologi kerana ciri-ciri morfologinya seakan-akan serupa antara satu sama lain.

Beberapa kajian yang telah dijalankan telah berjaya mengklasifikasikan dan mengkategorikan *Fusarium* dari seksyen *Liseola* dan seksyen *Elegans* kepada seksyen masing-masing dengan lebih tepat (Young-Mi *et al.*, 2000). Kaedah biologi molekul juga didapati dapat memberi maklumat variasi genetik spesies *Fusarium* yang mungkin tidak dapat diketahui melalui pemerhatian atau kaedah lain seperti analisis VCG. Analisis VCG mempunyai beberapa limitasi yang menyukarkan proses penilaian terhadap populasi *Fusarium* yang luas (Edel *et al.*, 1995). Variasi maklumat genetik ini boleh dibahagikan kepada variasi intraspesifik iaitu variasi yang hadir di bawah aras spesies dan variasi interspesifik iaitu variasi yang hadir antara spesies atau antara famili dan sebagainya (Ahmad Sofiman, 2004).

Antara kaedah biologi molekul yang sering digunakan ialah Polimorfisma DNA Rawak Teramplikasi (RAPD) dan Polimorfisma Panjang Jalur Terpotong (RFLP). Kedua-dua kaedah ini digabungkan dengan Tindakbalas Berantai Polimerase (PCR) bagi meningkatkan keberkesanannya. Kedua-dua teknik RAPD dan RFLP mempunyai kelebihan, kelemahan, tempoh masa dan sensitiviti yang berbeza.

2.6.1 Analisis Polimorfisma DNA Rawak Teramplikasi (RAPD)

PCR-RAPD dilakukan untuk mengamplifikasi hasil DNA berbeza saiz yang berterabur secara rawak daripada keseluruhan genom. Dalam kaedah ini pencetus-pencetus oligonukleotida rawak digunakan tanpa perlu mengetahui maklumat jujukan DNA yang hendak diamplifikasi (Williams *et al.*, 1990).

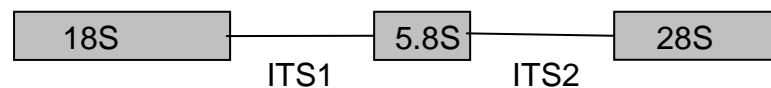
Pencetus-pencetus rawak yang biasa digunakan bersaiz pendek iaitu kira-kira 10 bes dan kadangkala hanya satu jenis pencetus sudah mencukupi. Pencetus yang sesuai dan terbaik biasanya ditemui secara cuba-cuba setelah RAPD dilakukan.

RAPD telah digunakan secara meluas untuk analisis diversiti genetik, pemetaan genom dan diagnostik genetik bagi kebanyakan spesies kulat. Antaranya ialah pengelasan spesies kulat *Trichoderma* menggunakan pencetus OPE-16, OPH-19, dan OPH-20 (Abbasi *et al.*, 1999), pencirian spesies *Ganoderma* dari kelapa sawit, pokok getah dan tumbuhan berkayu (Abu-Seman *et al.*, 1996) dan membezakan dua spesies *Aspergillus* yang mempunyai morfologi yang hampir sama iaitu *A. paraciticus* dan *A. sojae* (Yuan *et al.*, 1995). Antara

penggunaannya untuk kajian *Fusarium*, RAPD telah berjaya menunjukkan diversiti genetik antara *F. oxysporum* dan forma spesialisnya yang dipencilkan dari pelbagai sumber (Choi *et al.*, 1997), variasi inter dan intraspesifik *Fusarium* yang dipencilkan dari kawasan tanaman kapas di Mesir (Abd-Elsalam *et al.*, 2003) dan pembezaan ras dan patotip pada *F. oxysporum* f.sp *ciceris* (Kelly *et al.*, 1994).

2.6.2 Analisis Polimorfisma Panjang Jalur Terpotong (PCR-RFLP) pada kawasan ITS1+ 5.8S+ITS2

DNA ribosom (rDNA) terdiri daripada kawasan gen-gen subunit 18S, 5.8S dan 28S dan dua kawasan tidak mengkod dan bervariasi iaitu ITS1 dan ITS2. ITS1 terletak di antara subunit 18S dan 5.8S manakala ITS2 pula di antara subunit 5.8S dan 28S (Gambarajah 2.1).



Gambarajah 2.1 : Kawasan-kawasan pada rDNA

Kawasan gen-gen rDNA seringkali digunakan untuk menganalisa susur galur evolusi kerana gen-gen ini terpelihara. Jujukan nukleotida pada kawasan ITS pula didapati lebih bervariasi menyebabkan kawasan ini seringkali digunakan untuk kajian taksonomi kulat. Antara kaedah molekular yang seringkali digunakan untuk gen-gen dan kawasan-kawasan rDNA ialah penjujukan dan PCR-RFLP pada kawasan-kawasan tersebut.

Penjujukan bermula dengan amplifikasi gen dan kawasan rDNA tertentu dari organisma yang dikaji. Penjajaran jujukan-jujukan kawasan gen-gen rDNA

dilakukan secara manual atau dengan bantuan program komputer. Semasa penjajaran dilakukan, kawasan yang sama atau kawasan yang berbeza pada rDNA boleh di ketahui. Maklumat ini kemudian dibezakan dengan rangkaian data jujukan yang telah ada untuk mengetahui dengan lebih mendalam lagi organisma yang dijujuk (Giovannoni *et al.*, 1990).

Penjujukan boleh memberikan maklumat tentang kawasan spesifik taksa tertentu dan ini membolehkan pencetus PCR yang spesifik dirangka untuk membantu dalam identifikasi sesuatu organisma dengan lebih mudah (Barry *et al.*, 1990). Melalui penjujukan pada kawasan ITS2, 12 pencilan *Fusarium* telah berjaya dikelompokkan kepada spesies masing-masing, apabila analisis filogenetik dilakukan (Young-Mi *et al.*, 2000). Penjujukan juga boleh mengesan mutasi yang mungkin berlaku pada rDNA dan menyebabkan kekeliruan pengelompokkan spesies apabila PCR-RFLP dilakukan. Kajian yang dilakukan oleh Young-Mi *et al.* (2000) telah mengesan berlakunya mutasi gen pada jujukan ITS2 *F. solani* f.sp. *piperis* (seksyen *Martiella*) dan menyebabkan pencilan ini dikelompokkan bersama spesies seksyen *Elegans* di dalam analisis kluster RFLP. Walau bagaimanapun penjujukan mengambil masa yang agak lama dan memerlukan mesin khas untuk melakukannya.

Kaedah PCR-RFLP pula bermula dengan amplifikasi salinan DNA pada kawasan yang dikehendaki menggunakan pencetus-pencetus tertentu bagi amplifikasi di kawasan ITS. Pencetus ITS1 dan ITS4 lazim digunakan. Bagaimanapun terdapat beberapa jenis pencetus lain yang pernah digunakan

seperti yang boleh didapati di laman web <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primer3.gif>.

Setelah selesai proses PCR, enzim pembatasan digunakan untuk mencerna kawasan ITS yang telah diampifikasi. Pemotongan enzim pembatasan pada jujukan DNA berlaku di jujukan tertentu yang dipanggil tapak pengenalan yang biasanya sepanjang 4 hingga 6 bes. Setelah dicerna dengan enzim pembatasan, setiap varieti dan spesies akan memberikan corak jalur RFLP tersendiri apabila dilarikan di atas gel agarosa.

Kaedah RFLP pada kawasan ITS ini telah digunakan untuk kajian identifikasi spesies kulat *Fusarium* (Young-Mi *et al.*, 2000), melihat variasi dalam kajian hubungkait antara strain-strain dalam spesies yang sama (Bruns *et al.*, 1991; Samuels dan Seifert, 1995) dan kajian filogenetik bagi spesies *Fusarium* yang bersifat fitopatogenik (Suga *et al.*, 2000). Contoh spesies *Fusarium* yang pernah dilaporkan menggunakan teknik PCR-RFLP untuk tujuan pencirian dan pembezaan strain-strain adalah *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Bosland dan Williams, 1987), *F. oxysporum* f. sp. *albedenis* (Fernandez *et al.*, 1997), *F. lateritium* (Hyun dan Clark, 1998) dan *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* (Plyler *et al.*, 2000).

Kawasan ITS juga didapati membantu dalam kajian taksonomi di peringkat spesies sebagai penunjuk pada kebanyakan kulat seperti *Pythium* (Chen, 1992), *Phytophthora* (Lee dan Taylor, 1992), *Verticillium* (Morton *et al.*, 1995) dan *F. solani* f. sp. *phaseoli* (O' Donnell dan Gray, 1995).

2.7 Orkid di Malaysia dan serangan *Fusarium* pada orkid

“Orchidaceae” ialah famili bunga-bunga yang merupakan kumpulan terbesar pokok berbunga. Pada masa ini orkid dinyatakan sebagai famili bagi superorder Lilliflorae dan boleh dikelaskan dalam order Orchidales.

Di Malaysia, pokok orkid pada peringkat awalnya hanya ditanam sebagai hobi sahaja namun kini telah wujud perusahaan secara komersial hasil dari permintaan yang meningkat. Antara orkid Malaysia yang popular di pasaran antarabangsa terdiri daripada genus *Aranda*, *Aranthera*, *Arachnis*, *Dendrobium*, *Holtumura*, *Kagawara*, *Mokara*, *Oncidium*, *Phalaenopsis* dan *Vanda*. Genus yang paling popular untuk ditanam secara komersial ialah *Aranda*, *Dendrobium*, *Mokara* dan *Oncidium* (Mohd Rejab, 1999). Di Malaysia sahaja, terdapat lebih daripada 120 genus dan 800 spesies angerik hutan/liar (Hassan dan Zainol, 1991). Saiz pokok orkid boleh didapati daripada 3 mm (paling kecil) sehingga kepada 4 meter atau lebih.

Spesies orkid di Malaysia mempunyai pelbagai bentuk dan warna yang menarik. Orkid merupakan tumbuhan monokotiledon yang dapat dibezakan dari segi bunga, akar, daun dan batangnya. Perbezaan-perbezaan ini yang menentukan genus dan spesies sesuatu orkid. *Dendrobium* dan *Oncidium* ialah genus-genus orkid yang paling banyak ditanam dan bunganya dieksport (Hassan dan Zainol, 1991).

Dendrobium ialah genus yang terbesar dalam famili Orchidaceae dan banyak digunakan sebagai orkid komersial (Mohd Rejab, 1999). Bebawang semunya

beruas-ruas dan mengandung air. Daun tebal dan sebahagiannya melekat pada batang. Genus mudah di kenali dengan melihat pada bentuk bunganya. Bunga *Dendrobium* berjambak dan mempunyai kolum yang pendek (Hassan dan Zainol, 1991).

Oncidium pula mempunyai bentuk bunga yang kecil berbanding spesies orkid yang lain. Kebanyakan bunganya berwarna kuning tetapi terdapat juga dalam pelbagai warna yang lain. Di kalangan penggemar orkid, *Oncidium* kadangkala di kenali sebagai “The dancing princess” atau “tiger orchids”. Ini adalah kerana corak bunganya yang kadangkala berbelang dan susunan bunga yang seolah-olah menari apabila ditiup angin. Bunganya yang kecil-kecil memenuhi hampir setiap ranting. *Oncidium* memerlukan pencahayaan yang banyak tetapi tidak tahan dengan cahaya panas secara terus.

Salah satu masalah besar dalam perusahaan orkid secara komersial ialah serangan penyakit yang disebabkan oleh kulat. Menurut Burnett (1986), penyakit orkid boleh dikategorikan kepada dua jenis iaitu jangkitan reput dan penyakit bintik yang melibatkan daun dan bunga. Antara kedua-duanya, penyakit reput adalah paling memusnahkan dan perebakannya boleh membunuh seluruh tanaman. Kerebakan penyakit reput adalah lebih cepat berbanding dengan serangan penyakit bintik daun atau bunga yang hanya melemahkan tanaman dan merosakkan kecantikan tanaman orkid sahaja.

Fusarium merupakan salah satu kulat yang menyebabkan penyakit pada orkid. Spesies-spesies *Fusarium* yang pernah dilaporkan menyebabkan penyakit

pada orkid ialah *F. oxysporum* (Benyon *et al.*, 1996; Salleh, 1997; Smith-White *et al.*, 2001), *F. solani*, *F. proliferatum* (Benyon *et al.*, 1996; Salleh, 1997), *F. subglutinans* (Benyon *et al.*, 1996) dan *F. nygamai* (Salleh, 1997). Gejala yang paling kerap dikenalpasti ialah reput akar (Benyon *et al.*, 1996, Smith-White *et al.*, 2001). Pereputan akar akan menghalang pemindahan air dan nutrien yang menyebabkan orkid kekurangan nutrien dan air untuk terus hidup dan akhirnya bertukar menjadi kekuningan dan berlakunya pengecutan daun-daun. Reput akar ini juga boleh menjangkiti bahagian-bahagian lain seperti 'pseudobulb' dan daun. Ini bergantung kepada tindakbalas perumah terhadap serangan dan keadaan persekitaran (Benyon *et al.*, 1996). Penyakit reput akar ini sukar dikawal kerana dengan jangkitan spora sahaja cukup untuk memulakan wabak penyakit. Selain itu ada dilaporkan juga penyakit tompokan pada bunga, buruk pucuk, 'black nose' (debunga yang diserang berubah daripada kelabu ke hitam sebelum betul-betul matang) dan reput pada batang.

Spora *Fusarium* mudah disebarkan oleh angin, percikan air semasa penyiraman, serangga dan sentuhan seperti sarung tangan. Adalah mustahil untuk menghapuskan penyakit apabila pokok telah dijangkiti, oleh itu pencegahan dan pengawalan pada peringkat awal amatlah perlu.

BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH

3.1 Kajian lapangan

Persampelan telah dilakukan di Nurseri Anggerik, Pusat Pertanian Relau, Pulau Pinang dan dua buah nurseri persendirian lain di Taiping Perak. Di lapangan, bahagian orkid yang menunjukkan gejala penyakit reput akar serta lesi dan pereputan pada batang telah diambil gambar dan seterusnya dipotong dan dibawa pulang ke makmal. Kesemua tisu berpenyakit yang disampel adalah dari orkid genus *Dendrobium* dan *Oncidium* yang berumur kira-kira 2-3 tahun. Selain itu lapan pencilan *Fusarium* dari orkid telah diperolehi dari stok Himpunan Kultur *Fusarium*, Universiti Sains Malaysia (H.K *Fusarium*, USM). Jadual 3.1 menunjukkan sampel yang telah diperolehi dari lapangan dan dari stok H.K *Fusarium*, USM.

3.2 Pemencilan dan penulenan kultur dari sampel dan penyediaan media

Bagi tujuan pensterilan permukaan, bahagian orkid yang dijangkiti dipotong kepada kepingan kecil berukuran 3 mm panjang bagi bahagian akar dan batang. Ia kemudian dibilas dengan air suling untuk menghilangkan kesan kotoran seperti tanah dan debu sebelum direndam dalam larutan natrium hipoklorit 5% selama 5 minit bagi tujuan pensterilan permukaan. Dengan menggunakan forsep steril, kepingan – kepingan tisu tadi diambil dan direndam di dalam air suling steril sebanyak 3 kali bagi mengeluarkan lebihan natrium hipoklorit 5% yang ada. Kepingan – kepingan tisu tadi dikeringkan dengan kertas turas yang steril.

Jadual 3.1: Data lokasi, bahagian dan genus orkid asal bagi pencilan yang dipencilkan di lapangan dan H.K Fusarium USM^a

No	Pencilan	Bahagian orkid	Genus orkid	Lokasi
1	AP1	Akar	<i>Dendrobium</i>	Relau, P. Pinang
2	AP2	Akar	<i>Dendrobium</i>	Relau, P. Pinang
3	AP3	Akar	<i>Dendrobium</i>	Relau, P. Pinang
4	AP4	Akar	<i>Dendrobium</i>	Relau, P. Pinang
5	AP5	Akar	<i>Dendrobium</i>	Relau, P. Pinang
6	AP6	Akar	<i>Dendrobium</i>	Relau, P. Pinang
7	AP7	Akar	<i>Oncidium</i>	Relau, P. Pinang
8	AP8	Akar	<i>Oncidium</i>	Relau, P. Pinang
9	AP9	Akar	<i>Oncidium</i>	Relau, P. Pinang
10	AP10	Akar	<i>Dendrobium</i>	Relau, P. Pinang
11	AP11	Akar	<i>Dendrobium</i>	Relau, P. Pinang
12	AT12	Akar	<i>Dendrobium</i>	Taiping , Perak
13	AT13	Akar	<i>Dendrobium</i>	Taiping , Perak
14	AT14	Akar	<i>Dendrobium</i>	Taiping , Perak
15	AT15	Akar	<i>Dendrobium</i>	Taiping , Perak
16	AT16	Akar	<i>Dendrobium</i>	Taiping , Perak
17	AT17	Akar	<i>Dendrobium</i>	Taiping , Perak
18	BP1	Batang	<i>Dendrobium</i>	Relau, P. Pinang
19	BP2	Batang	<i>Dendrobium</i>	Relau, P. Pinang
20	BP3	Batang	<i>Dendrobium</i>	Relau, P. Pinang
21	BP4	Batang	<i>Dendrobium</i>	Relau, P. Pinang
22	BP5	Batang	<i>Dendrobium</i>	Relau, P. Pinang
23	BT6	Batang	<i>Dendrobium</i>	Taiping , Perak
24	BT7	Batang	<i>Dendrobium</i>	Taiping , Perak
25	BT8	Batang	<i>Dendrobium</i>	Taiping , Perak
26	BT9	Batang	<i>Dendrobium</i>	Taiping , Perak
27	BT10	Batang	<i>Dendrobium</i>	Taiping , Perak
28	BT11	Batang	<i>Dendrobium</i>	Taiping , Perak
29	BT12	Batang	<i>Dendrobium</i>	Taiping , Perak
30	BT13	Batang	<i>Dendrobium</i>	Taiping , Perak
31	BT14	Batang	<i>Dendrobium</i>	Taiping , Perak
32	BT15	Batang	<i>Dendrobium</i>	Taiping , Perak
33	1325	Tiada rekod	Tiada rekod	H.K <i>Fusarium</i> USM
34	1374	Tiada rekod	Tiada rekod	H.K <i>Fusarium</i> USM
35	1377	Tiada rekod	Tiada rekod	H.K <i>Fusarium</i> USM
36	1378	Tiada rekod	Tiada rekod	H.K <i>Fusarium</i> USM
37	1380	Tiada rekod	Tiada rekod	H.K <i>Fusarium</i> USM
38	1381	Tiada rekod	Tiada rekod	H.K <i>Fusarium</i> USM
39	1257	Tiada rekod	Tiada rekod	H.K <i>Fusarium</i> USM
40	1493	Tiada rekod	Tiada rekod	H.K <i>Fusarium</i> USM

^a Himpunan Kultur Fusarium Universiti Sains Malaysia

Seterusnya, tisu terjangkit tersebut dipindahkan ke atas Agar Peptone PCNB (PPA) menggunakan forsep yang steril. Medium ini merupakan medium selektif yang menghalang pertumbuhan kebanyakan kulat dan bakteria tetapi membenarkan pertumbuhan *Fusarium* secara perlahan.

Bahan-bahan dan kaedah yang digunakan untuk menyediakan media bagi pencirian secara morfologi dilampirkan di Lampiran 1.

3.3 Penghasilan spora tunggal

Pemencilan spora tunggal bertujuan untuk mendapatkan pencilan tulen. Sedikit miselium kulat diambil daripada pencilan pada permukaan plat PPA dan dipindahkan ke dalam botol Bijou yang mengandungi air suling yang steril. Botol Bijou digoncang untuk memastikan penyebaran spora kulat sekata. Ampaian spora kemudian di coret di atas Agar Kentang Sukrosa (PSA) menggunakan gelung inokulasi. Piring petri PSA kemudian dieram selama 24-36 jam sehingga spora tunggal terbentuk dan dipindahkan ke atas Agar Cebisan Daun Teluki (CLA) dan Agar Kentang Dektrosa (PDA) Difco™ untuk proses pencirian secara morfologi.

3.4 Pencirian secara morfologi

Pencirian secara morfologi melibatkan pencilan yang dikultur di atas CLA yang dieram pada jangkamasa lebih kurang 7-10 hari di bawah lampu pendaflour. Untuk pemerhatian kehadiran klamidospora pula, medium CLA di eram sehingga 14 hari. Sedikit sporodokia dari permukaan medium CLA diambil dan dicalit pada larutan air suling di atas permukaan slaid dan diperhatikan di

bawah mikroskop cahaya bermula dari magnifikasi x100 (10x) dan ditingkatkan kepada magnifikasi x200 (20x). Pemerhatian dibuat untuk melihat sama ada terdapat kehadiran mikrokonidia dan makrokonidia. Bentuk mikrokonidia dicatatkan. Bagi makrokonidia pula ciri-ciri yang diperhatikan ialah bentuk, saiz, bilangan septa dan bentuk sel apikal dan sel basal. Pemerhatian juga dibuat secara terus (*in situ*) dari medium CLA untuk memerhatikan jenis sel konidiogenus (monofialid atau polifialid) dan pembentukan mikrokonidia sama ada secara berantai atau 'false-head'. Bagi pencilan selepas 14 hari pula, slaid dibuat untuk memerhatikan sama ada terdapat pembentukan klamidospora yang mungkin terdapat pada hifa, permukaan agar atau terbenam di dalam agar. Kesemua pemerhatian dibuat menggunakan mikroskop cahaya (Olympus BX50) yang disambungkan dengan kamera (JVC 3-CCD Color Video Camera) terus ke komputer untuk tujuan dokumentasi. Bagi pemerhatian yang mengelirukan seperti kehadiran klamidospora, Agar Tanah (SA) digunakan sebagai medium pengkulturan untuk memberikan pemerhatian klamidospora yang lebih jelas dan tepat.

Untuk pencirian berdasarkan kriteria sekunder, medium PDA (Difco™) digunakan. Pencilan dieram selama 10 hari pada suhu bilik. Morfologi koloni diperhatikan iaitu dengan mencatatkan warna koloni, pigmentasi pada agar dan hifa dan ketebalan pembentukan hifa. Pencilan juga dieram di dalam gelap pada suhu 25°C dan 30 °C selama 3 hari. Diameter koloni ditentukan dengan mengukur pertumbuhan radial pada permukaan piring petri.

3.5 Pengekalan pencilan

Medium rendah nutrien iaitu Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA) digunakan untuk medium pengekalan pencilan. Pencilan diinokulasi pada agar condong SNA dan disimpan di dalam peti sejuk pada suhu 4°C.

3.6 Ujian kepatogenan

3.6.1 Ujian kepatogenan ke atas akar

Ujian kepatogenan dilakukan terhadap tiga spesies *Fusarium* (*F. solani*, *F. oxysporum* dan *F. proliferatum*) yang telah disampel dari bahagian akar. Setiap spesies diwakili oleh dua pencilan. Jadual 3.2 menunjukkan pencilan-pencilan yang digunakan untuk ujian ini.

Jadual 3.2 : Pencilan yang digunakan untuk ujian kepatogenan ke atas akar

Pencilan	Spesies	Bahagian ^a	Genus orkid ^b
AP1 AP7	<i>F. oxysporum</i>	akar akar	<i>Dendrobium</i> <i>Oncidium</i>
AP4 AP8	<i>F. solani</i>	akar akar	<i>Dendrobium</i> <i>Oncidium</i>
AP11 AT10	<i>F. proliferatum</i>	akar akar	<i>Dendrobium</i> <i>Dendrobium</i>

^a Bahagian orkid yang dijangkiti pada perumah asal

^b Genus orkid perumah asal

Pencilan ditumbuhkan di atas medium PSA selama kira-kira 7-8 hari. Air suling steril kemudian digunakan untuk mengampai spora. Kepekatan spora pencilan yang ingin ditularkan kepada orkid *Dendrobium* yang sihat ditentukan dengan menggunakan hemositometer dengan kepekatan yang diinginkan iaitu 1×10^6 per ml.

Eksperimen dilakukan di Rumah Tumbuhan USM. Rekabentuk Rawak Lengkap (CRD) telah digunakan. 50 ml ampaian spora AP1, AP7, AP4, AP8, AP11 dan AT10 disemur pada bahagian akar *Dendrobium* dengan lima replikat bagi setiap pencilan. Semburan kawalan menggunakan air suling juga melibatkan lima replikat. Selepas itu bahagian akar orkid dikerkup dengan plastik yang dilubangkan sedikit buat beberapa hari untuk mempertahankan kelembapan bagi merangsang percambahan spora. Orkid-orkid disusun pada jarak yang sesuai untuk mengelakkan percampuran jangkitan akibat percikan dari siraman. Siraman dilakukan sehari sekali dan kain jala hitam direntangkan bagi mengelakkan sinaran matahari terlalu terik. Ini adalah untuk mewujudkan keadaan kelembapan sama seperti di lapangan di mana pencilan-pencilan ini dipencilkan. Pemerhatian dilakukan setiap 4 hari untuk melihat sebarang gejala yang mungkin muncul. Penskoran dibuat selepas hari ke 20.

Untuk ujian kepatogenan ke atas akar simptom di skor secara rawak dengan memilih empat akar setiap pokok dan tahap reput akar dinilai mengikut skala 0 - 5 dimodifikasi dari Benyon *et al.* (1996) (Jadual 3.3).

Jadual 3.3: Skala jangkitan pada akar orkid yang dimodifikasi daripada Benyon *et al.* (1996)

Skala	Tahap jangkitan
0	akar sihat dengan kortek hijau
1	20% pereputan
2	40% pereputan
3	60% pereputan
4	80% pereputan
5	100% pereputan

3.6.2 Ujian kepatogenan ke atas batang

Ujian kepatogenan juga dilakukan terhadap tiga spesies (*F. solani*, *F. oxysporum* dan *F. proliferatum*) yang dipencilkan dari bahagian batang. Jadual 3.4 menunjukkan pencilan-pencilan yang digunakan untuk ujian kepatogenan.

Jadual 3.4 : Pencilan yang digunakan untuk ujian kepatogenan ke atas batang

Pencilan	Spesies	Bahagian orkid ^a	Genus orkid ^b
BP1 BP2	<i>F. oxysporum</i>	batang batang	<i>Dendrobium</i> <i>Dendrobium</i>
BP5 BT7	<i>F. solani</i>	batang batang	<i>Dendrobium</i> <i>Dendrobium</i>
BT10 BT15	<i>F. proliferatum</i>	batang batang	<i>Dendrobium</i> <i>Dendrobium</i>

^a Bahagian orkid yang dijangkiti pada perumah asal

^b Genus orkid perumah asal

Pencilan yang ditumbuhkan di atas medium PSA diampaiakan dengan air suling steril. Kepekatan spora pencilan yang ingin ditularkan kepada batang *Dendrobium* ditentukan dengan menggunakan hemositometer dengan kepekatan yang diinginkan iaitu 1×10^6 per ml.

Eksperimen dikendalikan secara Rekabentuk Rawak Lengkap (CRD). Batang *Dendrobium* dilukakan sedikit dan kemudian 50 ml ampaiakan spora BP1, BP2, BP5, BT7, BT10 dan BT15 disemur pada bahagian yang dilukakan. Kapas yang lembab dilekatkan dengan pita selofan pada bahagian yang dilukakan. Setiap pencilan melibatkan lima replikat pokok. Air suling juga disemurkan kepada lima pokok kawalan.

Siraman dilakukan sehari sekali dan kain jala hitam direntangkan bagi mengelakkan sinaran matahari terlalu terik. Pokok-pokok disusun pada jarak