

**KEPATOGENAN GANODERMA BONINENSE PADA KELAPA SAWIT  
DAN HUBUNGAN BIOLOGINYA DENGAN GANODERMA SPP.  
DARIPADA PERUMAH PALMA LAIN**

Oleh  
CHAN JER JING

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

**April 2007**

## **PENGHARGAAN**

Setinggi-tinggi ucapan terima kasih saya rakamkan kepada Profesor Madya Dr. Liew Kon Wui, selaku bekas penyelia projek, dan Dr. Latiffah Zakaria, selaku penyelia projek, atas segala bimbingan, ajaran dan nasihat yang telah diberikan sepanjang projek dijalankan dan penulisan thesis.

Ucapan terima kasih juga ingin saya rakamkan kepada pensyarah-pensyarah yang lain, terutamanya, Profesor Baharuddin Salleh, Dr. Maziah Zakaria dan Profesor Chan Lai Keng; kakitangan Pusat Pengajian Sains Kajihayat terutamanya kakitangan di Makmal Patologi Tumbuhan, Unit Electron Microscope dan bahagian rumah tumbuhan, atas segala tunjuk ajar dan bantuan teknikal yang disumbangkan.

Kepada rakan-rakan seperjuangan saya di Makmal Penyelidikan 117, terima kasih atas persahabatan, motivasi dan bantuan yang dihulurkan sepanjang kerja makmal dijalankan.

Dan akhir sekali, saya merakamkan kesyukuran kepada keluarga dan teman saya atas pemahaman, galakan dan pengorbanan, di mana telah memberi semangat kepada saya sepanjang tempoh pengajian.

## KANDUNGAN

	MUKASURAT
<b>PENGHARGAAN</b>	ii
<b>KANDUNGAN</b>	iii
<b>SENARAI JADUAL</b>	vii
<b>SENARAI RAJAH</b>	ix
<b>SENARAI PLAT</b>	x
<b>ABSTRAK</b>	xiii
<b>ABSTRACT</b>	xv
<b>1.0 PENGENALAN</b>	1
<b>2.0 TINJAUAN BAHAN BACAAN</b>	5
2.1 Kelapa Sawit	5
2.1.1 Industri Kelapa Sawit	6
2.2 Penyakit Reput Pangkal Batang	6
2.2.1 Kejadian Penyakit	7
2.2.2 Gejala Penyakit	8
2.2.3 Organisme Penyebab	10
2.2.4 Penyebaran Penyakit	11
2.2.5 Histopatologi	12
2.2.6 Kawalan Penyakit	13
2.3 Biologi Kulat <i>Ganoderma</i>	15
2.3.1 Keserasian Seksual	16
2.3.2 Dwikariotisasi	19
2.4 Ujian Kepatogenan	21
2.5 Kajian Molekular	24
2.5.1 Kawasan Penjarak Transkripsi Dalam (ITS) dan Gen 5.8S	25
2.5.2 Tindakbalas Rantaian Polimerase – Polimorfisme Panjang Jalur Terpotong (PCR-RFLP) Kawasan ITS1-5.8S-ITS2	26
<b>3.0 BAHAN DAN KAEDAH</b>	30
3.1 Medium Yang Digunakan	30

## MUKASURAT

3.2	Pencilan <i>Ganoderma</i>	30
3.2.1	Pemencilan Miselium	31
3.3	Pengaruh Basidiokarp	31
3.3.1	Substrat Blok Kayu Getah	32
3.3.2	Substrat Habuk Kayu Getah	33
3.4	Pemencilan Spora Tunggal	34
3.4.1	Kultur Monokarion	37
3.5	Ujian Keserasian	38
3.5.1	Kacukan antara Strain-strain <i>G. boninense</i> Hos Kelapa Sawit dengan Strain-strain <i>Ganoderma</i> spp. pada Hos Kelapa Sawit	40
3.5.2	Kacukan antara Strain-strain <i>G. boninense</i> Hos Kelapa Sawit dengan Strain-strain <i>Ganoderma</i> spp. pada Hos Palma yang Lain	41
3.5.3	Kacukan antara Strain-strain <i>G. tornatum</i> Hos Kelapa Sawit dengan Strain-strain <i>Ganoderma</i> spp. pada Hos Kelapa Sawit dan Hos Palma yang Lain	42
3.6	Ujian Kepatogenan	44
3.6.1	Penyediaan Inokulum	44
3.6.2	Ujian Kepatogenan pada Pokok Semaian	45
3.6.3	Ujian Kepatogenan pada Anak Pokok	46
3.6.4	Pemerhatian Jangkitan	48
3.6.4.1	Pemerhatian pada Pokok Semaian	48
3.6.4.2	Pemerhatian pada Anak Pokok	49
3.6.5	Ujian Statistik	49
3.7	Kajian Molekular	50
3.7.1	Penyediaan Kultur	50
3.7.2	Pengekstrakan DNA	52
3.7.3	Amplikasi PCR pada Kawasan ITS dan Gen 5.8S rDNA	53
3.7.4	Penyediaan Gel Agarosa dan Elektroforesis	54
3.7.5	Analisis Polimorfisme Panjang Jalur Terpotong (RFLP) Hasil PCR ITS1-5.8S-ITS2	55
3.7.6	Analisis Data	56

	<b>MUKASURAT</b>
<b>4.0 KEPUTUSAN</b>	<b>57</b>
4.1 Pengaruh Basidiokarp	57
4.1.1 Substrat Blok Kayu Getah	57
4.1.2 Substrat Habuk Kayu Getah	57
4.2 Pemencilan Miselium	58
4.3 Pemencilan Spora Tunggal	58
4.4 Ujian Keserasian	61
4.4.1 Kacukan antara Strain-strain <i>G. boninense</i> Hos Kelapa Sawit dengan Strain-strain <i>Ganoderma</i> spp. pada Hos Kelapa Sawit	65
4.4.2 Kacukan antara Strain-strain <i>G. boninense</i> Hos Kelapa Sawit dengan Strain-strain <i>Ganoderma</i> spp. pada Hos Palma yang Lain	66
4.4.3 Kacukan antara Strain-strain <i>G. tornatum</i> Hos Kelapa Sawit dengan Strain-strain <i>Ganoderma</i> spp. pada Hos Kelapa Sawit dan Hos Palma yang Lain	66
4.5 Ujian Kepatogenan	68
4.5.1 Ujian Kepatogenan pada Pokok Semaian	68
4.5.2 Ujian Kepatogenan pada Anak Pokok (Blok Kayu Getah Kecil)	74
4.5.3 Ujian Kepatogenan pada Anak Pokok (Blok Kayu Getah Besar)	77
4.5.4 Perbandingan antara Blok Kayu Kecil dan Blok Kayu Kecil	79
4.6 Kajian Molekular	80
4.6.1 RFLP Kawasan ITS-5.8S-ITS2	80
4.6.1.1 Corak Jalur Pembatasan oleh <i>Msp</i> I	84
4.6.1.2 Corak Jalur Pembatasan oleh <i>Taq</i> I	85
4.6.1.3 Corak Jalur Pembatasan oleh <i>Alu</i> I	87
4.6.1.4 Corak Jalur Pembatasan oleh <i>Bsu</i> 15I	88
4.6.1.5 Corak Jalur Pembatasan oleh <i>Eco</i> RI	90
4.6.1.6 Corak Jalur Pembatasan oleh <i>Hind</i> III	91
4.6.1.7 Corak Jalur Pembatasan oleh <i>Hin</i> fl	93
4.6.2 Analisis Data	94

	<b>MUKASURAT</b>
<b>5.0 PERBINCANGAN</b>	97
5.1 Ujian Keserasian	97
5.2 Ujian Kepatogenan	103
5.3 Kajian Molekular	109
5.4 Perbincangan Am	114
<b>6.0 KESIMPULAN</b>	119
<b>BIBLIOGRAFI</b>	120
<b>LAMPIRAN</b>	

## SENARAI JADUAL

JADUAL		MUKASURAT
3.1	Kultur tulen dwikarion yang diperolehi daripada MPOB	31
3.2	Senarai Kultur Monokarion .....	37
3.3	Kombinasi-kombinasi Kacukan untuk Mendapatkan Strain Penguji .....	38
3.4	Kombinasi Kacukan diantara Per 71 dengan 337035, NPG1, Por68, LPOP78/5/3 dan LPOP78/5/5 .....	41
3.5	Kombinasi Kacukan di antara Per 71 dengan SWP, MAP dan BPC .....	42
3.6	Kombinasi kacukan di antara NPG 1 dengan 337035, Por68, LPOP78/5/3, LPOP78/5/5, SWP, MAP dan BPC .....	43
3.7	Inokulum untuk Ujian Kepatogenan Kaedah Blok Kayu Getah Besar .....	46
3.8	Inokulum untuk Ujian Kepatogenan Kaedah Blok Kayu Getah Kecil .....	47
3.9	Skala penilaian tisu reput akibat serangan <i>Ganoderma</i>	49
3.10	Senarai kultur yang digunakan dalam kajian molekular	51
3.11	Enzim pembatasan berserta tapak pengecaman yang digunakan dalam RFLP bagi hasil PCR kawasan ITS1-5.8S-ITS2 .....	55
4.1	Keputusan kacukan-kacukan yang serasi dengan pembentukan penghubung kaput (+) bagi LPOP78/5/3	63
4.2	Strain-strain penguji untuk LPOP78/5/3 .....	64
4.3	Strain-strain penguji yang dipilih untuk dijalankan ujian keserasian .....	64
4.4	Keputusan Kacukan diantara Per 71 dengan 337035, NPG 1, Por 68, LPOP78/5/3 dan LPOP78/5/5 .....	65
4.5	Keputusan Kacukan di antara Per 71 dengan SWP, MAP dan BPC .....	66

## MUKASURAT

4.6	Keputusan Kacukan di antara NPG 1 dengan 337035, Por 68, LPOP78/5/3, LPOP78/5/5, SWP, MAP dan BPC .....	67
4.7	Penilaian tisu reput pada pokok semaian akibat serangan <i>Ganoderma</i> – Ujian 1 .....	68
4.8	Penilaian tisu reput pada pokok semaian akibat serangan <i>Ganoderma</i> – Ujian 2 .....	73
4.9	Penilaian tisu reput pada anak pokok akibat serangan <i>Ganoderma</i> – blok kecil .....	74
4.10	Penilaian tisu reput pada anak pokok akibat serangan <i>Ganoderma</i> – blok kecil .....	77
4.11	Penilaian tisu reput pada anak pokok akibat serangan <i>Ganoderma</i> – blok kecil dan blok besar .....	80
4.12	Anggaran saiz-saiz jalur pembatasan kawasan ITS1 5.8 S – ITS2 isolat-isolat <i>Ganoderma</i> hasil daripada pencernaan enzim pembatasan <i>Msp</i> I, <i>Taq</i> I dan <i>Alu</i> I .....	82
4.13	Anggaran saiz-saiz jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 isolat-isolat <i>Ganoderma</i> hasil daripada pencernaan enzim pembatasan <i>Bsu</i> 15I, <i>Eco</i> RI, <i>Hind</i> III dan <i>Hin</i> fl .....	83
4.14	Pengkelompokan isolat-isolat <i>Ganoderma</i> daripada hos-hos yang berlainan hasil daripada analisis RFLP kawasan ITS dan gen 5.8S .....	96

## SENARAI RAJAH

RAJAH		MUKASURAT
2.1	Kitar hidup kulat <i>Ganoderma</i> .....	17
2.2	Basidium dengan empat jenis basidiospora .....	18
2.3	Dwikariotisasi dan pembentukan penghubung kaput .....	20
2.4	Parameter yang terlibat dalam ujian kepatogenan <i>Ganoderma</i> .....	23
2.5	rDNA dengan kawasan ITS dan gen 5.8S rDNA .....	26
3.1	Tatacara pemencilan spora tunggal .....	36
3.2	Ringkasan tatacara untuk mendapatkan strain penguji	39
3.3	Penginokulatan Pokok Semaian dengan Kaedah Blok Kayu Getah Besar .....	45
3.4	Penginokulatan Anak Pokok dengan Kaedah Blok Kayu Getah .....	47
3.5	Gambarajah menunjukkan kawasan ITS dan gen 5.8S (ITS1-5.8S-ITS2) serta tapak penyepuhan primer ITS1 dan ITS4 .....	53
4.1	Dendrogram hasil daripada analisis RFLP kawasan ITS dan gen 5.8S .....	95

## SENARAI PLAT

PLAT		MUKASURAT
2.1	Kehadiran basidiokarp pada pangkal batang pokok kelapa sawit terjangkit yang telah tumbang, di Ladang Pelam, Kedah .....	10
3.1	Bahagian himenium basidiokarp <i>Ganoderma</i> .....	35
4.1	Pengaruh basidiokarp menggunakan substrat blok kayu getah .....	57
4.2	Pengaruh basidiokarp dengan cara habuk kayu getah .....	58
4.3	Miselium <i>Ganoderma</i> a. Permukaan atas plat .....	59
4.4	Miselium <i>Ganoderma</i> b. Permukaan bawah plat .....	59
4.5	Basidium yang menghasilkan empat basidiospora a. Basidium b. Sterigma c. Basidiospora .....	59
4.6	Basidiospora <i>Ganoderma</i> .....	60
4.7	Kultur tulen monokarion <i>Ganoderma</i> pada PDA .....	61
4.8	Pasangan monokarion yang tidak serasi, sempadan terbentuk di antara dua koloni.....	62
4.9	Pasangan monokarion yang serasi, tiada sempadan terbentuk di antara dua koloni.....	62
4.10	Penghubung kapit yang terbentuk pada miselium dwikarion .....	62
4.11	Pertukaran warna dari putih ke perang tua atau hitam pada akar yang dijangkiti penyakit RPB .....	69
4.12	Pereputan pangkal batang pada pokok semaian .....	70
4.13	Basidiokarp bertumbuh pada pangkal batang pokok semaian .....	70
4.14	Pokok semaian yang mati akibat diserang penyakit RPB .....	71
4.15	Pokok-pokok semaian yang diinokulat dengan miselium monokarion dan miselium dwikarion .....	72
4.16	Kehadiran 'brown halo' pada GSM menunjukkan kehadiran <i>Ganoderma</i> .....	72
4.17	Pereputan pada akar dan batang pada anak pokok yang diinokulat dengan miselium dwikarion (blok kayu getah kecil) .....	75

## MUKASURAT

4.18	Anak-anak pokok yang diinokulat dengan miselium monokarion dan miselium dwikarion (blok kayu getah kecil) .....	76
4.19	Pereputan pada akar dan batang pada anak pokok yang diinokulat dengan miselium dwikarion .....	78
4.20	Pereputan pada akar dan batang pada anak pokok yang diinokulat dengan miselium dwikarion .....	79
4.21	Hasil PCR kawasan ITS1-5.8S-ITS2 pencilan yang diamplifikasi dengan primer ITS1 dan ITS4 .....	80
4.22	Hasil PCR kawasan ITS1-5.8S-ITS2 pencilan yang diamplifikasi dengan primer ITS1 dan ITS4 .....	80
4.23	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Msp</i> I .....	84
4.24	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Msp</i> I .....	84
4.25	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Msp</i> I .....	85
4.26	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Taq</i> I .....	85
4.27	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Taq</i> I .....	86
4.28	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Taq</i> I .....	86
4.29	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Alu</i> I .....	87
4.30	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Alu</i> I .....	87
4.31	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Alu</i> I .....	88
4.32	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Bsu</i> 15I .....	88
4.33	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Bsu</i> 15I .....	89
4.34	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Bsu</i> 15I .....	89

**MUKASURAT**

4.35	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Eco</i> RI .....	90
4.36	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Eco</i> RI .....	90
4.37	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Eco</i> RI .....	91
4.38	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Hind</i> III .....	91
4.39	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Hind</i> III .....	92
4.40	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Hind</i> III .....	92
4.41	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Hin</i> fl .....	93
4.42	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Hin</i> fl .....	93
4.43	Corak jalur pembatasan kawasan ITS1-5.8S-ITS2 yang dicerna menggunakan enzim pembatasan <i>Hin</i> fl .....	94

**KEPATOGENAN *GANODERMA BONINENSE* PADA KELAPA SAWIT DAN  
HUBUNGAN BIOLOGINYA DENGAN *GANODERMA* SPP. DARIPADA  
PERUMAH PALMA LAIN**

**ABSTRAK**

Ujian kepatogenan dilakukan pada pokok semaian dan anak pokok yang bercambah daripada biji benih menggunakan miselium monokarion dan dwikarion untuk menyelidik peranan dwikarionisasi dalam jangkitan penyakit Reput Pangkal Batang. Keputusan menunjukkan miselium monokarion adalah tidak patogenik dan hanya miselium dwikarion berupaya menjangkiti kelapa sawit. Kaedah anak pokok yang bercambah daripada biji benih diletakkan pada blok kayu getah yang dikolonisasi oleh miselium dwikarion menghasilkan keputusan yang cepat dan konsisten di mana gejala mula ditunjukkan pada bulan keempat selepas penginokulatan.

Ujian keserasian seksual telah dijalankan dengan menggunakan strain-strain penguji monokarion untuk mengkaji perhubungan biologi antara *G.boninense* dari kelapa sawit dengan *Ganoderma* spp. dari hos palma yang lain. Keputusan menunjukkan *G. boninense* boleh berkacuk dengan *G. miniatocinctum* dan *G. zonatum* serta pencilan-pencilan *Ganoderma* daripada kelapa sawit, palma 'sealing wax', palma 'MacArthur', dan kelapa. Oleh itu, *G.boninense* adalah konspesifik dengan pencilan-pencilan tersebut. Manakala *G. tornatum* tidak boleh berkacuk dan adalah tidak konspesifik dengan pencilan-pencilan *Ganoderma* hos palma yang lain.

Berdasarkan corak jalur PCR-RFLP kawasan ITS1-5.8S-ITS2 menunjukkan pencilan dari perumah yang berlainan memberikan corak jalur pembatasan yang berbeza. Analisis kluster UPGMA corak jalur pembatasan mengelompokkan pencilan-pencilan *Ganoderma* dari perumah palma dan perumah tumbuhan kayu keras (teh dan getah) ke dalam kluster yang berlainan. Oleh itu, analisis PCR-RFLP kawasan ITS1-5.8S-ITS2 boleh digunakan untuk menyokong data ujian keserasian dalam penentuan perhubungan antara spesies *Ganoderma*.

**PATHOGENICITY OF *GANODERMA BONINENSE* AND ITS BIOLOGICAL  
RELATIONSHIPS WITH *GANODERMA* SPP. FROM OTHER PALM HOSTS**

**ABSTRACT**

Pathogenicity tests were carried out on oil palm seedlings and germinated seeds using monokaryotic and dikaryotic mycelia in order to investigate the role of dikaryotization in conferring pathogenicity. The results showed that monokaryotic isolates were non-pathogenic while reconstituted dikaryotic mycelia can initiate basal stem rot infection. The inoculation method of placing germinated oil palm seeds in direct contact with rubberwood blocks well-colonized with dikaryotic mycelia gave faster and consistent results as the disease symptoms started to appear four months after inoculation.

Mating compatibility tests were carried out using *Ganoderma* monokaryon tester strains to study the biological relationship of *G.boninense* from oil palm and *Ganoderma* spp. from other palm hosts. The results showed that *G. boninense* crossed with other *Ganoderma* isolates from oil palm, including *G. miniatocinctum* and *G. zonatum*, as well as isolates from sealing wax palm, MacArthur palm and coconut. However, *G. tornatum* did not cross, which showed that it is not conspecific with all the other *Ganoderma* isolates from other palm hosts.

Molecular analyses using PCR-RFLP of ITS1-5.8S-ITS2 showed that different restriction patterns were obtained from isolates from different hosts. UPGMA cluster analysis of the restriction patterns showed that *Ganoderma* isolates from various palms and hard wood (tea and rubber) were clustered separately. Therefore, PCR-

RFLP analysis of ITS1-5.8S-ITS2 strongly supports mating data in species delimitation of *Ganoderma*.

## 1.0 PENGENALAN

Kelapa sawit memainkan peranan yang penting dalam kehidupan, di mana tanaman ini membekalkan sumber makanan kepada manusia, sebagai sumber bahan mentah kepada industri global, menyediakan peluang pekerjaan, dan menjana ekonomi kepada rantau yang menghasilkannya, terutamanya negara-negara yang sedang membangun (Majlis Minyak Sawit Malaysia, 2005a).

Pada tahun 1960-an, kawasan penanaman kelapa sawit di Malaysia adalah 55,000 ha, dan pengeluaran minyak kelapa sawit sebanyak 0.1 juta tan. Pada tahun 2004, kawasan penanaman telah meningkat ke 3.8 juta hektar dan pengeluaran minyak kelapa sawit mencapai 13.98 juta tan, iaitu kira-kira separuh daripada jumlah pengeluaran dunia (Majlis Minyak Sawit Malaysia, 2005b; Basiron & Chan, 2006).

Antara masalah yang dihadapi dalam industri penanaman kelapa sawit adalah masalah serangan penyakit. Penyakit yang paling serius menjangkiti pokok kelapa sawit di Malaysia adalah reput pangkal batang (RPB) yang disebabkan oleh serangan kulat *Ganoderma boninense*. Pokok kelapa sawit yang diserang penyakit RPB boleh menyebabkan kerugian hasil dari dua segi, iaitu mengurangkan bilangan tandan dan berat buah; dan membunuh pokok.

Di antara strategi kawalan yang diamalkan adalah penggunaan racun kulat, kaedah operasi, kaedah timbusan tanah dan kaedah sanitasi. Langkah-langkah ini hanya dapat melanjutkan tempoh ekonomi pokok tetapi tidak dapat memusnahkan patogen. Kawalan jangka panjang melibatkan penyaringan baka sawit untuk menghasilkan varieti yang mempunyai kerintangan atau toleran terhadap penyakit RPB (Idris & Ariffin, 2003).

Dalam usaha menangani masalah RPB, terdapat keraguan dan masalah yang dihadapi oleh para penyelidik. Di antaranya adalah taksonomi kulat *Ganoderma* yang serba mengelirukan disebabkan oleh faktor-faktor seperti kewujudan bentuk yang heterogeneous dan kriteria yang berbeza berdasarkan kaedah pengecaman yang berbeza (Flood & Hasan, 2004). Bilangan spesies *Ganoderma* yang dilaporkan menyerang pokok kelapa sawit di Malaysia adalah berbeza mengikut penyelidik yang berlainan (Turner, 1981; Ho & Nawawi, 1985; Khairuddin, 1991a; Idris *et al.*, 2000a, 2000b; Latiffah *et al.*, 2002).

Dengan perkembangan kajian molekular, teknik-teknik berteraskan tindak balas rantaian polimerase (PCR) telah membantu dalam taksonomi kulat *Ganoderma*. Terdapat beberapa kajian menggunakan teknik molekul berteraskan PCR telah dilakukan untuk membantu pengecaman spesies dan melihat perhubungan filogenetik dan filogeografik spesies-spesies *Ganoderma* daripada negara-negara yang berbeza (Moncalvo *et al.*, 1995a & 1995b; Hseu *et al.* 1996, Gottlieb & Wright, 1999; Gottlieb *et al.*, 2000; Smith & Sivasithamparam, 2000). Secara keseluruhannya teknik berteraskan PCR ini dapat membantu dan boleh digunakan dalam pengecaman spesies-spesies *Ganoderma*.

Cara penyebaran penyakit juga sering dibahaskan oleh para penyelidik. Turner (1981) melaporkan bahawa jangkitan dan penyebaran *Ganoderma* berlaku melalui persentuhan akar. Walau bagaimanapun, terdapat beberapa kajian yang mencadangkan penyakit RPB boleh juga disebarkan oleh spora (Miller, 1995; Ariffin *et al.*, 1996; Sanderson & Pilotti, 1997; Flood *et al.* 2002, Hasan & Flood, 2003; Flood & Hasan, 2004).

Kaedah ujian kepatogenan yang berbeza telah dicadangkan dan dilakukan oleh para penyelidik tetapi semuanya memerlukan tempoh pengeraman yang panjang (Navaratnam & Chee, 1965; Khairudin *et al.*, 1991a; Lim *et al.*, 1992; Idris *et al.*, 2000b). Baru-baru ini, Breton *et al.* (2006) telah menetapkan satu set parameter di mana penginokulatan patogen telah berjaya dilakukan pada biji benih kelapa sawit yang telah bercambah dan gejala penyakit dapat diperhatikan seawal tiga bulan selepas penginokulatan dibuat.

Oleh itu, untuk menjawab beberapa persoalan yang sering ditimbulkan, objektif kajian yang dilakukan adalah:

1. Mengkaji perhubungan biologi *G.boninense* dari kelapa sawit dengan *Ganoderma* spp. dari perumah palma yang lain menggunakan ujian keserasian seksual.
2. Menyiasat peranan basidiospora dan fenomena dwikariotisasi dalam penyebaran penyakit RPB dengan menjalankan ujian kepatogenan menggunakan miselium monokarion dan miselium dwikarion pada pokok kelapa sawit.
3. Membuat perbandingan teknik penginokulatan blok kayu getah pada pokok semaian kelapa sawit dan pada anak pokok kelapa sawit yang baru bercambah dari biji benih, untuk menentukan kaedah ujian kepatogenan yang sesuai.
4. Melakukan analisis secara molekular menggunakan teknik tindak balas rantaian polimerase – polimorfisme panjang jalur terpotong (PCR- RFLP)

kawasan penjarak transkripsi dalaman dan gen 5.8S (ITS1-5.8S-ITS2), untuk melihat pertalian antara pencilan-pencilan *Ganoderma* yang dipencilkan daripada perumah kelapa sawit, palma-palma lain, teh, dan getah.

## 2.0 TINJAUAN BAHAN BACAAN

### 2.1 KELAPA SAWIT

Pokok kelapa sawit (*Elaeis guineensis*) tumbuh secara liar atau ditanam di kawasan khatulistiwa antara 10°N dan 10°S . Namun demikian, bukti sejarah dan fosil menunjukkan bahawa Afrika, terutamanya Afrika Barat, merupakan kawasan asal usul spesies kelapa sawit ini (Ng, 1957).

Di Afrika tropika, buah pokok palma ini digunakan secara meluas oleh penduduk tempatan di mana minyak dari isirong dan perikapanya diperolehi. Pada tahun 1870, kelapa sawit diambil dari Botanical Gardens, Singapura dan mula diperkenalkan di Malaysia (Arasu, 1966). Hanya pada tahun 1917, kelapa sawit mula ditanam secara komersial di Estet Tennamaram, Kuala Selangor, iaitu kira-kira 40 batu dari Kuala Lumpur. Sejak tahun 1961 kebanyakan tanaman kelapa sawit adalah dari varieti *Tenera* (*Deli dura* x *Pisifera*) sehingga ianya menjadi satu-satunya varieti tanaman komersial di Malaysia (Tan, 1983).

Secara anatomi, kelapa sawit digolongkan bersama dengan *Cocos* (kelapa) dan genera yang lain di bawah 'tribe' *Cocoineae*, famili *Palmae*, dan merupakan kumpulan monokotiledon (Tan, 1983). Secara morfologi, kelapa sawit mempunyai sistem akar serabut yang meluas, batang yang tegak berukuran 0.3-0.6m diameter dan ketinggian yang melebihi 16m apabila mencapai usia 30 tahun. Pada bahagian atas batang, kira-kira 25-40 pelepah membentuk umbun pokok kelapa sawit. Buah kelapa sawit berbentuk daripada hampir sfera hingga bujur atau memanjang. Buah kelapa sawit terdiri daripada kulit atau eksokarpa yang nipis, isi buah atau mesokarpa yang berminyak, tempurung atau endokarpa yang keras dan isirong

atau endosperma. Warna buah kelapa sawit yang masak adalah jingga pekat hingga merah keperangan. Tandannya mempunyai berat kira-kira 80-100 kg (Ng, 1957).

### **2.1.1 Industri Kelapa Sawit**

Kawasan penanaman kelapa sawit telah meningkat daripada 55,000 ha pada tahun 1960 ke 3.8 juta hektar pada tahun 2004. Sejak 1997, kawasan penanaman kelapa sawit telah melebihi 50% daripada jumlah kawasan penanaman bagi tanaman-tanaman utama yang lain di Malaysia, seperti getah, koko, kelapa, lada, nenas, tembakau, padi, kopi, teh dan tebu (Basiron & Ma, 1999, Majlis Minyak Sawit Malaysia, 2005a).

Dengan meningkatnya kawasan penanaman kelapa sawit, industri minyak kelapa sawit menjadi industri utama di Malaysia. Kini Malaysia adalah pengeluar dan pengeksport minyak kelapa sawit terbesar di dunia di mana penghasilan minyak kelapa sawit mencapai 52.5% pasaran dunia. Pada tahun 2004, pengeluaran meningkat ke 13.98 juta tan berbanding dengan 2.57 juta tan pada tahun 1980. (Basiron & Ma, 1999; Faizah *et al.*, 2005, Basiron & Chan, 2006).

## **2.2 PENYAKIT REPUT PANGKAL BATANG**

Antara masalah yang dihadapi dalam industri penanaman kelapa sawit adalah masalah serangan penyakit. Di Malaysia, antara penyakit yang boleh menjangkiti kelapa sawit adalah reput pangkal atas, reput tandan, reput pangkal arang, reput batang basah, kulapok jelaga dan bintik daun alga, tetapi kejadian semua penyakit tersebut adalah rendah dan tidak membimbangkan. Penyakit yang paling serius

menjangkiti pokok kelapa sawit adalah reput pangkal batang (RPB) di mana serangan RPB didapati boleh menggugat industri sawit negara jika kejadian penyakit adalah tinggi (Turner, 1981; Idris & Ariffin, 2003).

Kejadian penyakit RPB bukan sahaja dilaporkan di Malaysia, malahan berlaku juga di Indonesia, Afrika, khususnya di Ghana, Nigeria, Zaire, Cameroon, San Tome & Principe, Angola, Zambia (Rhodesia utara) dan Tanzania, serta di Oceania-Papua New Guinea (Turner, 1981).

### **2.2.1 Kejadian Penyakit**

Pada awalnya, di Malaysia, Thompson (1931) mengesan bahawa penyakit ini menyerang pokok kelapa sawit yang berusia lebih daripada 25 tahun. Pada ketika itu, penyakit RPB dianggap tidak begitu serius. Apabila pokok kelapa sawit ditanam secara meluas pada tahun 1960-an sebagai tanaman ladang yang utama, kejadian penyakit RPB turut meningkat dan didapati menyerang pokok yang berusia 10-15 tahun (Turner, 1981). Lama-kelamaan RPB mula menyerang pokok yang lebih muda berusia 4-5 tahun (Gurmit, 1990).

Kejadian penyakit RPB telah dilaporkan berlaku pada pokok kelapa sawit yang ditanam di semua jenis tanah, iaitu tanah pantai, pendalaman, gambut dan lateritik. Di Semenanjung Malaysia, kejadian penyakit dilaporkan di sepanjang kawasan pantai barat, terutamanya di Seberang Prai, Sungai Kerian, Teluk Intan, Banting, Gemencheh, Segamat dan Pontian. Kejadian dilaporkan lebih serius pada pokok kelapa sawit yang ditanam di tanah bekas tanaman kelapa di mana tunggul-tunggul dibiarkan mereput di ladang-ladang (Idris & Ariffin, 2003).

Pokok kelapa sawit yang diserang penyakit RPB akan menyebabkan kerugian hasil dari dua segi, iaitu mengurangkan bilangan tandan dan berat buah; dan membunuh pokok. Jika kejadian penyakit adalah kurang daripada 10%, maka tiada kesan ketara terhadap pengeluaran hasil sawit (Idris dan Ariffin, 2003). Walau bagaimanapun, di ladang-ladang di kawasan pantai barat, di mana penyakit telah mencapai kadar wabak, penyakit RPB boleh membunuh sehingga 85% pokok kelapa sawit apabila mencapai usia 25 tahun (Gurmit, 1990). Kerugian sebanyak 50% turut dilaporkan pada pokok yang berada pada separuh hayat ekonomi (Turner, 1981).

### **2.2.2 Gejala Penyakit**

Secara amnya, gejala daun yang pertama pada pokok tua ialah pengeluaran pucuk daun yang berganda berbanding dengan pokok sihat yang biasanya mengeluarkan dua hingga tiga pucuk daun sebulan. Pucuk daun kelihatan berwarna hijau pudar berbanding dengan daun pokok sihat yang berwarna hijau. Pelepah di bahagian petiol akan patah dan tergantung mengelilingi bahagian atas batang pokok. Pelepah menjadi kering dan mati bermula daripada pelepah tua. Seterusnya, pelepah yang kering ini akan gugur secara bergilir (Turner, 1981). Pada pokok muda pula, daun pada pelepah tua berwarna kekuningan, kadangkala di hujung daun menjadi kering atau nekrotik. Akhirnya seluruh daun dan pelepah menjadi layu dan kering. Pokok yang dijangkiti menunjukkan pertumbuhan yang lemah dan terbantut (Idris & Ariffin, 2003). Walaupun begitu, gejala daun tidak dapat mendiagnosis penyakit RPB kerana faktor persekitaran turut mempengaruhi pertumbuhan daun (Turner, 1981).

Kehadiran lesi pada pangkal batang pokok dapat membantu diagnosis penyakit RPB. Kawasan pembentukan lesi di tisu pangkal batang mereput, berwarna coklat

cerah serta berbentuk tidak sekata. Ini merupakan “zon reaksi” bagi jangkitan patogen kulat *Ganoderma*. Di bahagian atas tisu yang dijangkiti, terdapat satu kawasan berwarna kuning. Kesan warna kuning menandakan terdapatnya mekanisme pertahanan oleh pokok terhadap serangan penyakit (Turner, 1981).

Selain daripada gejala daun dan lesi pada batang, jasad berbuah iaitu basidiokarpa mula terbentuk sama ada pada akar, batang atau pangkal pokok (**Plat 2.1**). Kemunculan basidiokarpa ini merupakan diagnosis yang nyata bahawa pokok kelapa sawit telah diserang kulat *Ganoderma*. Mulanya, basidiokarpa berbentuk seperti struktur butang putih dan berkembang membentuk struktur cuping. Biasanya basidiokarpa berwarna kuning keperangan atau perang gelap pada permukaan atas. Bahagian bawah dan sisinya pula berwarna putih. Pada permukaan bawah basidiokarpa, terdapat beribu-ribu liang seni. Dalam liang-liang seni ini terdapat basidiospora (Idris & Ariffin, 2003).

Apabila jangkitan menjadi teruk, tisu pada pangkal batang akan reput, dan seterusnya pokok akan mati. Pokok yang dijangkiti akan mati dalam jangka masa satu hingga tiga tahun selepas terbitnya gejala penyakit pada daun dan pelepah. Kulat *Ganoderma* yang berada dalam akar dan batang akan terus mengkolonisasi seluruh batang sehingga tisu hancur (Idris & Ariffin, 2003).



**Plat 2.1** : Kehadiran basidiokarpa pada pangkal batang pokok kelapa sawit terjangkit yang telah tumbang, di Ladang Pelam, Kedah.

### **2.2.3 Organisma Penyebab**

Penyakit reput pangkal batang disebabkan oleh kulat *Ganoderma*. Sebanyak 15 spesies *Ganoderma* telah dilaporkan merupakan patogen penyakit RPB. Di antara 15 spesies tersebut, tujuh spesies dilaporkan di Semenanjung Malaysia, iaitu *G. applanatum*, *G. boninense*, *G. chaliceum*, *G. lucidum*, *G. miniatocinctum*, *G. pseudoferreum* dan *G. tornatum* (Turner, 1981).

Ho dan Nawawi (1985) menjalankan kajian secara morfologi ke atas basidiokarpa *Ganoderma* spp. yang tumbuh pada pokok kelapa sawit yang berpenyakit di pelbagai lokasi di Semenanjung Malaysia, dan mendapati *G. boninense* merupakan spesies yang utama menyerang pokok-pokok kelapa sawit.

Ujian kepatogenan terhadap *G. boninense* dan *G. tornatum* menunjukkan bahawa kedua-dua spesies adalah patogenik terhadap kelapa sawit secara *in vitro* (Khairudin, 1991a), manakala *G. philippi* dan *G. lucidum* tidak menjangkiti kelapa sawit (Khairudin, 1991b).

Idris *et al.* (2000a, 2000b) pula melaporkan terdapat empat spesies *Ganoderma* yang menyerang pokok kelapa sawit di ladang-ladang di Malaysia. Spesies-spesies tersebut dikenalpasti dan dikelaskan kepada tiga kategori, iaitu Jenis A yang paling agresif (*G. boninense*), Jenis B yang kurang agresif (*G. zonatum* dan *G. miniatocinctum*) dan Jenis C yang saprofitik (*G. tornatum*).

Latiffah *et al.* (2002b) juga mendapati *G. boninense* merupakan spesies utama yang menyebabkan penyakit RPB pada pokok-pokok kelapa sawit di beberapa lokasi di Semenanjung Malaysia.

#### **2.2.4 Penyebaran Penyakit**

*Ganoderma* merupakan parasit fakultatif yang hidup secara saprofitik pada pangkal dan batang pokok yang mereput yang menjadi sumber makanannya (Flood & Hasan, 2004). Turner (1981) melaporkan bahawa jangkitan dan penyebaran *Ganoderma* berlaku melalui persentuhan akar. Kejadian penyakit bermula apabila terdapat sentuhan antara akar pokok yang sihat dengan tisu akar atau batang pokok asal yang telah dijangkiti kulat *Ganoderma* yang dibiarkan mereput di ladang. Kulat *Ganoderma* akan menjangkiti dan tumbuh ke dalam akar sehingga jangkitan sepanjang akar sampai ke pangkal batang pokok kelapa sawit. Melalui persentuhan akar pokok sihat dengan pokok terjangkit, maka beberapa tapak jangkitan akan terbentuk di dalam sesuatu ladang, kemudiannya tapak-tapak jangkitan ini akan bercantum membentuk tompokan penyakit yang besar (Idris & Ariffin, 2003).

Turner (1981) juga melaporkan bahawa fungsi basidiospora *Ganoderma* dalam penyebaran penyakit adalah amat tidak jelas. Dengan penyebaran yang begitu luas, dijangka setiap pokok kelapa sawit dalam satu ladang akan dijangkiti penyakit RPB jika basidiospora berupaya menyebarkan jangkitan. Percubaan untuk menginokulat pokok sihat dengan spora dan kajian saiz inokulum telah menunjukkan bahawa spora tidak mempunyai keupayaan inokulum yang mencukupi untuk menyebabkan jangkitan terus pada pokok kelapa sawit.

Terdapat beberapa kajian yang tidak menyokong teori yang dikemukakan oleh Turner (1981), terutamanya melalui kajian keserasian vegetatif. Hasil beberapa kajian keserasian vegetatif mendapati basidiospora mungkin memainkan peranan dalam jangkitan dan penyebaran penyakit (Miller,1995; Ariffin *et al.*,1996). Hasil kajian keserasian vegetatif yang dilakukan oleh Miller (1995) dan Ariffin *et al.* (1996) mendapati kultur-kultur yang diperolehi daripada basidiokarpa *Ganoderma* pada pokok-pokok kelapa sawit dalam ladang yang sama, menunjukkan ketidakserasian vegetatif di mana satu garisan pemisahan yang jelas diperhatikan pada sempadan antara dua kultur yang bertemu. Kajian ini juga menunjukkan kultur-kultur tersebut mempunyai kevariabelan yang amat berbeza dan ia tidak berasal dari punca yang sama. Selain kajian keserasian vegetatif, kajian RFLP DNA mitokondria (mtDNA) terhadap kultur-kultur *Ganoderma* daripada pokok kelapa sawit daripada ladang yang sama, mendapati ianya merupakan individu yang berasingan.

### **2.2.5 Histopatologi**

Kolonisasi dan tindakan kulat *Ganoderma* dalam tisu batang dan akar pokok kelapa sawit yang telah dijangkiti menyebabkan timbulnya simptom penyakit pada daun. Kajian histopatologi yang telah dijalankan menunjukkan kulat *Ganoderma* merupakan penyakit vaskular, di mana jangkitan berlaku melalui pergerakan

miselium dalam floem dan xilem. Kehadiran miselium dalam tisu vaskular mengganggu proses pengambilan air dan makanan. Oleh itu, timbulnya simptom penyakit di bahagian pucuk dan pelepah. Di bahagian akar pula, miselium berada dalam sel empulur, korteks, endodermis perisikel dan parenkima (Idris & Ariffin, 2003).

Pada bahagian batang yang terjangkit, terdapat satu garisan hitam (*black line*) yang memisahkan tisu yang terjangkit dengan yang sihat. Hifa kulat *Ganoderma* membentuk struktur rehat klamidospora dan berada pada sel berdekatan dan dalam garisan hitam. Kebolehan patogen ini membentuk struktur rehat dalam tisu perumah merupakan suatu mekanisme yang membolehkan ia memanjangkan hayat hidupnya dalam perumah (Ariffin *et al.*, 1989).

#### **2.2.6 Kawalan Penyakit**

Industri sawit di Malaysia sedang berusaha untuk mengawal penyakit RPB dengan mengurangkan dan menghapuskan inokulum kulat *Ganoderma* di ladang, terutamanya sebelum penanaman semula dijalankan. Kawalan jangka panjang melibatkan penyaringan baka sawit untuk menghasilkan varieti yang mempunyai rintangan atau toleran terhadap penyakit RPB (Idris & Ariffin, 2003).

Sanitasi merupakan kaedah terbaik untuk menghapuskan inokulum *Ganoderma*. Pokok tua yang dijangkiti, diracun dan ditumbang dengan jentolak. Pangkal batang yang masih berada dalam tanah dikorek dan dikumpulkan untuk dimusnahkan. Lubang yang dikorek ditimbus semula dengan tanah baru (Idris & Ariffin, 2003).

Turner (1981) juga mencadangkan formulasi organo-merkuri dan suntikan kalium hidroksi-quinolin sulfat, tetapi percubaan menggunakan racun kulat tersebut untuk mengawal penyakit adalah tidak berkesan. Penggunaan racun pewart Dazomet juga telah digunakan di mana selepas satu tahun rawatan, didapati racun ini membunuh patogen dan residunya tiada kesan fitotoksik ke atas pokok kelapa sawit. Kajian di makmal juga menunjukkan racun kulat dari kumpulan *triazole* mempunyai potensi untuk membunuh kulat *Ganoderma*. Racun kulat ini telah digunakan di ladang melalui teknik suntikan batang dan pembasahan tanah (soil drenching), tetapi keputusan adalah tidak memuaskan (Idris & Ariffin, 2003).

Kaedah surgeri pokok dilakukan dengan membuang tisu batang dan akar terjangkit bersama sedikit tisu sihat di bahagian pangkal, kemudian disapu dengan tar arang (coaltar) bercampur dengan racun kulat seperti Thiram. Akan tetapi, kejayaan kaedah ini amat bergantung pada tahap kerosakan pokok yang diserang oleh kulat *Ganoderma* (Idris & Ariffin, 2003).

Kaedah timbusan tanah (soil mounding) merupakan satu lagi pendekatan yang diamalkan di beberapa buah ladang di Malaysia, terutamanya untuk pokok berusia lebih 10 tahun. Ini dilakukan dengan menimbus tanah di sekeliling pangkal pokok berpenyakit seluas 1m tinggi dan 0.75m lebar. Kaedah ini dapat melanjutkan tempoh ekonomi pokok tetapi tidak membunuh patogen (Idris & Ariffin, 2003).

### 2.3 BIOLOGI KULAT *GANODERMA*

Kulat *Ganoderma* tergolong dalam filum Basidiomycota yang merupakan kulat peringkat tinggi, kelas Basidiomycetes, Order Polyporales, Famili Ganodermataceae dan genus *Ganoderma* (Alexopolous *et al.*, 1996).

*Ganoderma* menghasilkan spora seks yang digelar basidiospora melalui struktur pembiakan yang dipanggil basidium. Basidiospora dihasilkan selepas plasmogami, kariogami dan meiosis. Kariogami dan meiosis berlaku dalam basidium dan empat basidiospora dihasilkan pada setiap basidium.

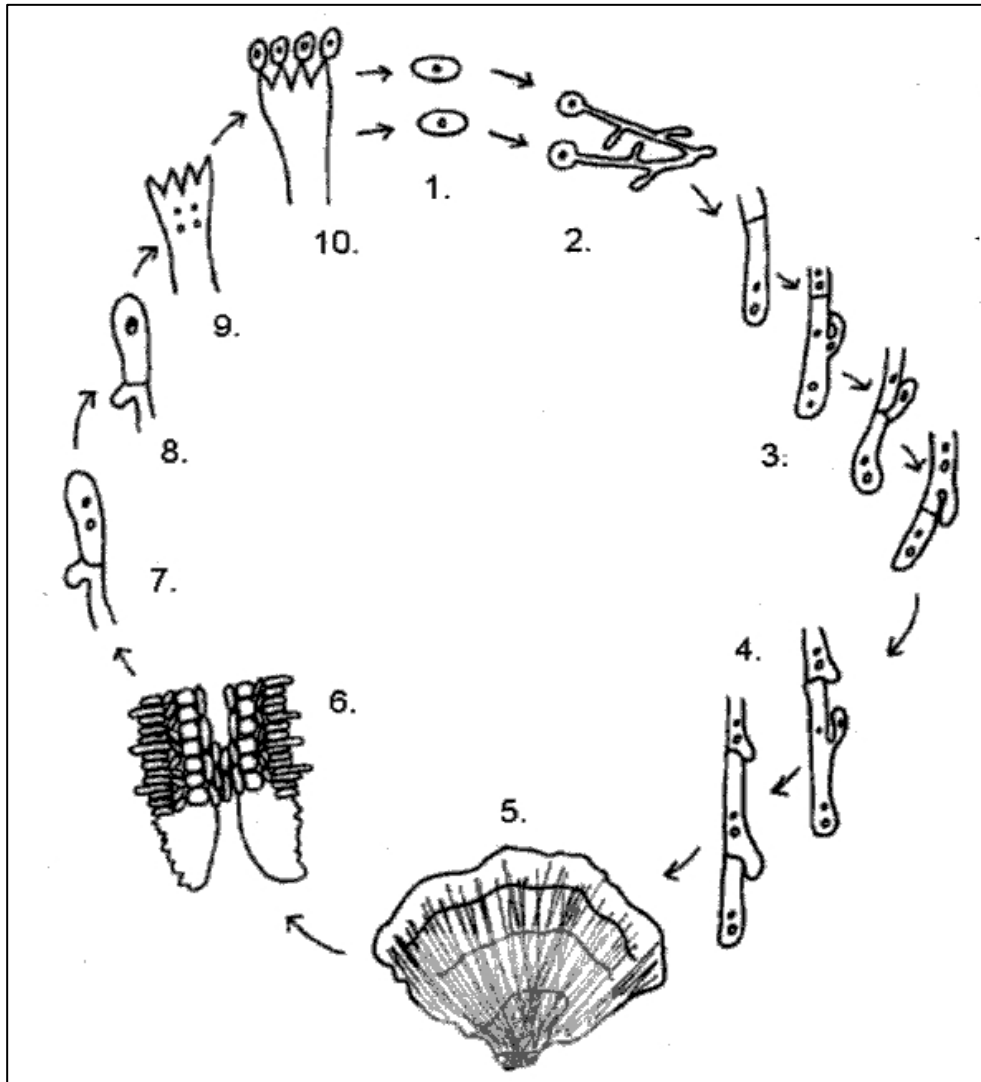
Jasad berbuah *Ganoderma* dikenali sebagai basidiokarpa. Mula-mulanya ia tumbuh sebagai struktur yang menyerupai butang kecil yang berwarna putih. Apabila ia semakin membesar, hujungnya berkembang dan membentuk struktur pepiring (Turner, 1981; Idris & Ariffin, 2003). Pepiring terbentuk daripada hujung tangkai pendek atau stip. Permukaan atas basidiokarpa mempunyai zon yang berwarna perang muda atau perang tua yang tidak sekata. Pada pinggirnya terdapat satu zon yang berwarna putih. Permukaan ini biasanya berkilauan terutamanya semasa basidiokarpa masih muda. Apabila ia cukup matang untuk menghasil dan membebaskan spora, permukaan atas biasanya diselaputi lapisan spora yang berwarna perang. Permukaan bawah basidiokarpa berwarna putih gelap dan mempunyai banyak liang seni. Liang-liang berkenaan sebenarnya merupakan bukaan bagi tiub-tiub vertikal. Tiub-tiub ini merupakan tempat spora-spora dibentuk (Turner, 1981). Lapisan permukaan tiub-tiub ini dipanggil himenium. Himenium terdiri daripada basidium dan struktur-struktur seperti basidioles dan cystidia (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Basidiospora *Ganoderma* adalah uniselular, haploid, berbentuk ellipsoid, bujur atau truncate. Idris *et al.* (2000a) yang menjalankan kajian pencirian *Ganoderma* yang menyerang pokok kelapa sawit melaporkan bahawa massa spora yang dikutip kelihatan perang kekuningan. Min panjang basidiospora adalah dari 7.1-13.8  $\mu\text{m}$  dan lebar 4.8 – 8.3  $\mu\text{m}$ .

Kitar hidup kulat *Ganoderma* dapat dicirikan seperti pada **Rajah 2.1** Basidiospora yang haploid dihasilkan oleh basidium (1). Basidiospora bercambah menjadi miselium monokarion. Dua monokarion yang serasi bertemu, pertaupan hifa dan plasmogami berlaku menghasilkan hifa dwikarion (2). Mekanisme dwikariotisasi berlaku di mana penghubung kaput (clamp connection) terbentuk bagi mengekalkan keadaan dwikarion pada miselium baru (3)&(4). Seterusnya basidiokarpa terbentuk (5). Lapisan himenium terbentuk (6) dan basidium terbentuk (7). Kariogami berlaku dalam basidium (8) dan selepas meiosis, empat nukleus haploid terbentuk (9). Pembentukan empat tonjolan merupakan peringkat awal pembentukan basidiospora (10). Seterusnya setiap nukleus bergerak ke tonjolan dan akhirnya empat basidiospora terhasil pada hujung basidium (Esser & Kuenen, 1967).

### **2.3.1 Keserasian seksual**

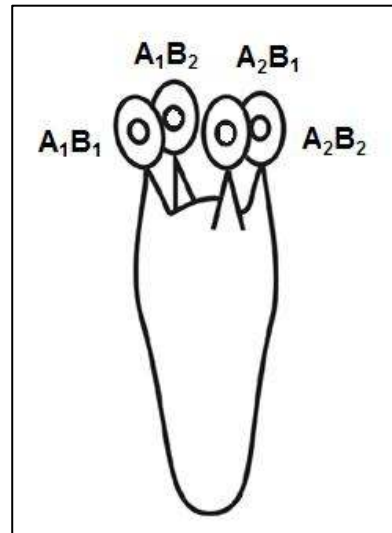
Keserasian adalah satu sifat genetik yang menentukan sama ada pertaupan hifa antara dua jasad kulat akan berlaku atau tidak. *Ganoderma* merupakan Basidiomycetes heterotalus di mana individu yang swamandul (*self-sterile*) memerlukan pertaupan antara dua talus yang serasi untuk pembiakan seksual. Keadaan ini mewajibkan kacukan luar (outcrossing) (Esser & Kuenen, 1967; Alexopoulos *et al.*, 1996).



**Rajah 2.1** : Kitar hidup kulat *Ganoderma* (Esser & Kuenen, 1967).

Di antara spesies heterotalus, kira-kira 75%, termasuklah *Ganoderma*, menunjukkan pengawanan tetrapolar termasuk. Keserasian dikawal oleh dua gen iaitu A dan B yang berbeza. Alel-alel bagi dua gen ini boleh ditunjukkan dengan nombor, iaitu  $A_1, A_2, B_1, B_2$ . Gen yang menentukan keserasian seksual ini dipanggil gen jenis pengawanan (mating type) (Esser & Kuenen, 1967; Casselton & Economou, 1985; Alexopoulos *et al.*, 1996).

Untuk pengawanan tetrapolar, dalam kes yang ringkas, terdapat empat jenis gen jenis pengawanan ialah  $A_1 B_1$ ,  $A_1 B_2$ ,  $A_2 B_1$ , dan  $A_2 B_2$  (**Rajah 2.2**). Oleh sebab kedua-dua gen A dan B menyusun dan terasing secara bebas semasa meiosis, dari satu jasad berbuah, empat jenis spora akan terbentuk dengan frekuensi yang sama.



**Rajah 2.2** : Basidium dengan empat jenis spora  
(Diubahsuai daripada Alexopoulos *et al.*, 1996)

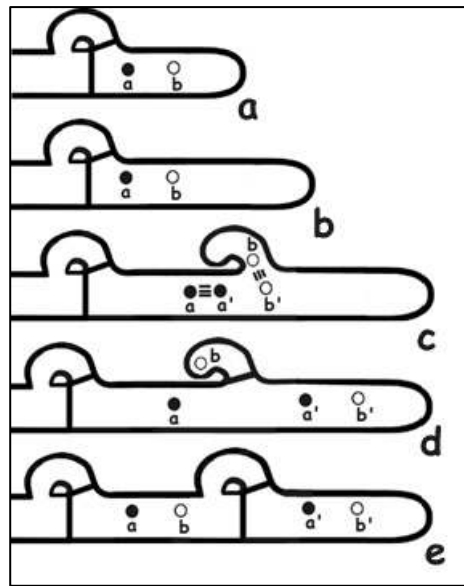
Pembentukan dwikarion dikawal oleh peraturan yang diformulasikan oleh Knip (1920) iaitu pasangan dengan alel yang sama tidak dapat membentuk homozigot selepas kariogami. Dengan kata lain dwikarion hanya akan terbentuk jika alel pada gen A dan B pada kedua-dua monokarion adalah tidak sama. Oleh yang demikian, peraturan pembiakbakaan dalam (inbreed) berlaku bagi mana-mana jasad berbuah adalah 25% (Esser & Kuenen, 1967; Webster, 1980; Casselton & Economou, 1985).

### 2.3.2 Dwikariotisasi

Basidiospora berada dalam peringkat haploid. Apabila basidiospora bercambah, nukleus haploid seterusnya mengalami mitosis bersama pertumbuhan hifa sehingga miselium primer yang merupakan homokarion (monokarion), iaitu mempunyai sejenis nukleus yang serupa (*identical*), dihasilkan. Apabila dua miselium primer yang berbeza genetiknya tetapi serasi (*compatible*) bertemu dan berinteraksi, penyatuan dua hifa homokarion yang berbeza berlaku (*hyphal anastomosis*) dan membentuk hifa heterokarion baru yang mangandungi dua jenis nukleus. Miselium sekunder yang merupakan heterokarion atau dwikarion mula tumbuh. Miselium tertiarinya adalah tisu yang teratur dan khusus, dan membentuk basidiokarpa (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Dwikarion dihasilkan melalui mekanisme yang digelar “dwikariotisasi” (*dikaryotization*). Mekanisma ini akan menghasilkan struktur khas yang digelar penghubung kaput (*clamp connection*) semasa konjugasi pembahagian nukleus pada hujung hifa. Pembentukan penghubung kaput akan memastikan setiap sel adalah dwinukleus (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Mekanisme dwikariotisasi dan pembentukan penghubung kaput diilustrasikan pada **Rajah 2.3**. Pertumbuhan berlaku di hujung hifa (a) dan seterusnya berlaku pemanjangan hujung hifa (b). Pembahagian nukleus (a-a') dan (b-b'), berlaku serentak dengan pemanjangan hifa dan bermulanya juga percabangan hifa yang akan membentuk kaput. Nukleus b akan migrasi ke percabangan hifa yang baru (c). Septum terbentuk di hujung kaput yang memerangkap nukleus b. Nukleus a' dan b' bermigrasi ke hujung hifa. Nukleus a pula bermigrasi jauh daripada hujung hifa (d). Septum terbentuk di bawah kaput yang baru dibentuk. Pergabungan kaput dengan sel yang bersebelahan akan membebaskan nukleus b ke sel tersebut (e).



**Rajah 2.3** : Dwikariotisasi dan pembentukan penghubung kapit

(Diubahsuai daripada Alexopoulos *et al.*, 1996)

Walaupun peranan dwikariotisasi pada kulat *Ganoderma* belum dikaji secara mendalam, tetapi pada sesetengah kulat yang merupakan patogen tumbuhan, terutamanya kulat karat dan smut yang juga merupakan Basidiomycetes, peranan dwikariotisasi telah dikaji dengan mendalam. Kajian menunjukkan bahawa sebelum kulat tersebut mempunyai keupayaan untuk memulakan jangkitan, dwikariotisasi mesti berlaku terlebih dahulu untuk menghasilkan hifa dwikarion yang bertanggungjawab menyerang perumah dan memulakan jangkitan dan menyebabkan penyakit (Agrios, 1988).

## 2.4 UJIAN KEPATOGENAN

Dalam kajian patologi tumbuhan, ujian kepatogenan atau Postulat Koch dijalankan untuk membuktikan hipotesis bahawa patogen yang telah dipencilkan adalah penyebab penyakit pada tumbuhan yang terjangkit (Agrios, 1988). Dalam usaha membuktikan kulat *Ganoderma* merupakan penyebab penyakit RPB pada kelapa sawit, ujian kepatogenan telah dijalankan oleh beberapa orang penyelidik seperti Navaratnam dan Chee (1965), Turner (1981), Khairudin (1991a&b), Lim *et al.* (1992), Idris *et al.* (2000b) dan Breton *et al.* (2006). Jenis inokulum, saiz inokulum, masa pengesanan dan kaedah ujian dijalankan merupakan faktor-faktor yang menentukan kejayaan sesuatu ujian kepatogenan.

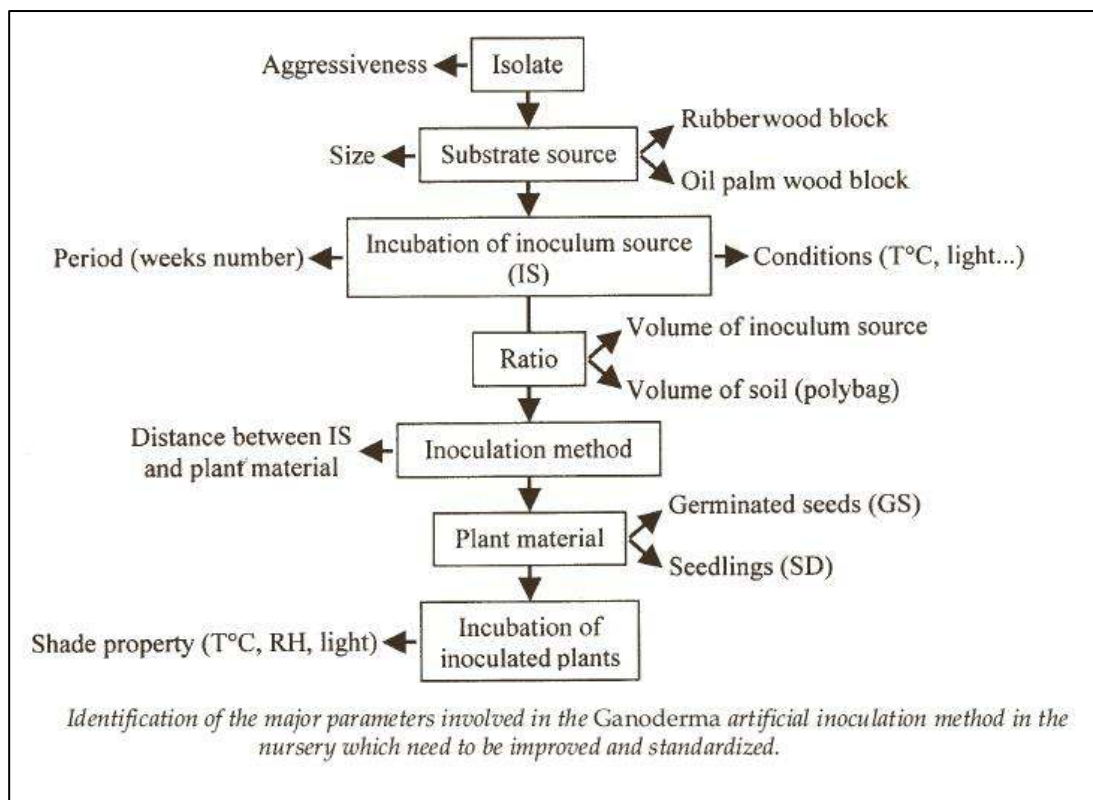
Navaratnam dan Chee (1965) menggunakan tisu pokok kelapa sawit terjangkit yang berukuran 750cm<sup>3</sup> sebagai inokulum dan mendapati 15 daripada 22 anak pokok berjaya dijangkiti. Gejala penyakit mula muncul selepas tujuh bulan diinokulat. Walau bagaimanapun, dengan menggunakan teknik yang sama, penyelidik yang lain tidak berjaya mendapat keputusan seperti yang diperolehi oleh mereka (Turner, 1981).

Khairudin (1991a) berjaya menjalankan ujian kepatogenan menggunakan kaedah inokulum blok kayu getah. Blok kayu getah yang berukuran 6x6x12cm atau 432cm<sup>3</sup>, diselaputi lapisan agar, diinokulat dengan kultur *Ganoderma* yang berusia 5 hari. Selepas dieram selama 10 minggu, inokulum blok kayu getah tersebut digunakan untuk menginokulat anak pokok kelapa sawit. Selepas 11 bulan *Ganoderma* berjaya dipencilkan daripada akar pokok yang terjangkit. Khairudin juga menjalankan ujian kepatogenan dengan kaedah inokulum yang dikulturkan pada substrat serat mesokarp kelapa sawit, tetapi tidak berjaya.

Lim *et al.* (1992) berjaya menjalankan ujian kepatogenan menggunakan kaedah inokulum dikulturkan dalam substrat bijirin di mana campuran 10g bijirin gandum, 10g bijirin oat dan 10ml air suling, dieram selama 10-14 hari pada suhu bilik. Inokulum ini diletakkan pada akar pokok kelapa sawit dan dibalut dengan parafilm dan pita selofan. Selepas 10 minggu, akar pokok kelapa sawit yang diinokulat menunjukkan semua gejala jangkitan RPB. Pemencilan semula *Ganoderma* daripada akar pokok yang terjangkit juga berjaya dilakukan. Inokulum yang sama juga digunakan untuk menginokulat pelepah pokok yang berusia 15 bulan. Luka dibuat pada pelepah menggunakan jarum yang steril sebelum penginokulan dibuat. Selepas 4-6 minggu, terdapat pertukaran warna dan nekrosis diperhatikan pada pelepah.

Idris *et al.* (2000b) pula menggunakan teknik penginokulan akar. Kultur *Ganoderma* ditumbuhkan dalam tabung uji yang mengandungi medium yang terdiri daripada campuran padi, habuk batang kelapa sawit, sukrosa, ammonium sulfat, kalsium sulfat dan bacto pepton (POPW). Setelah miselium memenuhi substrat, ia digunakan sebagai inokulum. Untuk ujian kepatogenan, anak pokok kelapa sawit yang ditanam dalam beg plastik dipilih di mana salah satu daripada akar tunjang utama diasingkan daripada yang lain melalui lubang yang dibuat pada polibeg. Akar kira-kira 3cm dimasukkan ke dalam tabung uji yang mengandungi kultur *Ganoderma*. Tabung uji tersebut disalut dengan parafilm dan dibalut dengan kertas perang supaya berada dalam keadaan gelap. Selepas 12 bulan, gejala luaran seperti kehadiran basidiokarpa dan pertukaran warna pelepah dapat diperhatikan. Anak pokok tersebut dibedah seterusnya untuk memeriksa gejala dalaman. Bahagian yang mengalami reputan yang serius diletakkan pada GSM dan pemencilan semula berjaya dilakukan.

Baru-baru ini, Breton *et al.* (2006), dalam usaha menjalankan ujian penyaringan jangkitan awal pada progeni kelapa sawit untuk mengesan ketoleranan penyakit, telah menetapkan satu set parameter supaya penginokulan patogen berjaya dilakukan pada pokok semaian biji benih kelapa sawit yang telah bercambah. Parameter yang ditentukan adalah keupayaan inokulum seperti tahap agresif patogen, tempoh pengeraman blok kayu getah sebelum digunakan, nisbah blok kayu getah dengan isipadu tanah, kualiti tempat teduhan sebagai faktor pra-disposisi dan sebagainya (**Rajah 2.4**). Apabila set parameter yang disebut di atas dioptimumkan, gejala penyakit dapat diperhatikan seawal tiga bulan selepas penginokulan dibuat pada biji benih kelapa sawit yang telah bercambah.



**Rajah 2.4** : Parameter yang terlibat dalam ujian kepatogenan *Ganoderma* (Breton *et al.*, 2006)

Selepas 25 – 30 minggu penginokulan, anak pokok dibedah dan dinilai secara anggaran visual perkadaran tisu yang reput akibat serangan *Ganoderma* mengikut skala penilaian tisu reput.

Menurut ujian kepatogenan yang dibuat oleh Breton *et al.* (2006), didapati perkembangan penyakit paling cepat di bawah teduhan semulajadi, tempoh pengeraman blok kayu getah di antara 12-16 minggu, nisbah blok kayu getah dengan isipadu tanah di antara 4%-7% dan akar anak pokok dcederakan sedikit.

Daripada ujian kepatogenan yang berjaya dilakukan, inokulum yang digunakan merupakan miselium *Ganoderma* yang ditumbuhkan pada substrat yang berlainan. Menurut Turner (1981), basidiospora *Ganoderma* tidak mempunyai keupayan inokulum yang mencukupi untuk menyebabkan jangkitan terus pada pokok kelapa sawit, tetapi, kajian daripada penyelidik yang lain menunjukkan basidiospora mungkin memainkan peranan dalam penyebaran penyakit (Miller, 1995; Ariffin *et al.*, 1996 ). Flood dan Hasan (2004) mencadangkan bahawa basidiospora mungkin tidak berupaya memulakan jangkitan secara langsung ataupun memerlukan keadaan yang amat spesifik untuk memulakan jangkitan.

## **2.5 KAJIAN MOLEKULAR**

Teknik Tindakbalas Rantai Polimerase (PCR) adalah tatacara *in vitro* untuk mensintesis jujukan DNA yang khusus, dengan mengamplifikasikan bilangan yang besar fragmen DNA yang berkompementari dengannya. Teknik ini dipelopori oleh Mullis dan rakan-rakannya dari Cetus Corporation. Pada mulanya, kegunaan PCR adalah terhad sehinggalah DNA polimerase yang stabil haba mudah diperolehi dan dengan itu telah banyak membantu dalam analisis DNA dan juga RNA (Graham, 1991).

Teknik PCR merupakan satu siri ulangan berkitar yang melibatkan denaturasi templat, penyepuhan primer dan pemanjangan primer yang telah menyepuh.