

Kajian Awal terhadap Sistem Pemilihan Somaklon Cili Yang Resistans kepada *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler & Bisby

NURINA ANUAR¹, ISMAIL B. AHMAD² dan AZIZAH HASHIM³

Jabatan Mikrobiologi, Fakulti Sains Hayat
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

Keywords: somaklon, cili, *Colletotrichum capsici*

ABSTRAK

Perlakuan toksin daripada patogen antraknos, *Colletotrichum capsici* ke atas kultur tisu cili telah digunakan sebagai satu kaedah pemilihan varian yang resistan terhadap patogen tersebut. Sediaan toksin kasar itu disterilkan dan kemudian dicampurkan ke dalam medium MS pada kepekatan 0, 10, 20, 30 atau 40% (v/v). Kepekatan toksin yang melebihi 20% telah menghalang pembentukan kalus daripada eksplan hipokotil, manakala perlakuan toksin tidak berupaya untuk meregenerasi. Sebaliknya, kalus yang dikulturkan pada medium MS yang ditambah dengan jus V8 dan medium kultur kawalan MS, masing-masing menghasilkan regenerasi sebanyak 37.6% dan 62.7%. Penginduksian varian yang resistans juga dilakukan melalui penginokulan kalus dengan konidium patogen antraknos. Antibiotik yang diekstrak daripada kulat antagonis, *Chaetomium trilaterale*, telah digunakan untuk menghalang perkembangan patogen pada medium daripada kalus cili. Daripada pengasaan antibiotik, perkembangan patogen adalah bergantung kepada dos antibiotik yang digunakan. Kepekatan minimum antibiotik yang berjaya menghalang pertumbuhan patogen sepenuhnya adalah 100 mg/ml. Pada kepekatan antibiotik yang digunakan itu pertumbuhan kulat patogen dicerap pada kalus tetapi tidak pada medium. Bagaimanapun, kalus tersebut mengalami pemerangan selepas 2 minggu penginokulan. Di samping itu, kalus yang bermandiri menjadi padat dan tidak berjaya diregenerasikan.

ABSTRACT

Toxin treatment from the anthracnose pathogen, *Colletotrichum capsici* on chilli tissue culture was utilised as the selection mechanism for variants which are resistant to this pathogen. The crude toxin preparation was sterilised and then added to the MS medium at the concentration of 0, 10, 20, 30 or 40% (v/v). At concentrations higher than 20%, the toxin prevented the formation of calli from hypocotyl explants, and at 10% and 20%, the formation of calli was strongly inhibited. The calli which survived the toxin treatment did not regenerate. Conversely, calli which were cultured on MS medium supplemented with V8 juice or on the control MS medium, were able to regenerate at 37.6% and 62.7%, respectively. Induction of resistant variants was attempted by inoculating the calli with the konidia from the anthracnose pathogen. The antibiotic which had been extracted from an antagonistic fungus, *Chaetomium trilaterale*, was added to the MS medium to limit the spread of the pathogen to the medium from the chilli calli. From the antibiotic assay, the development of the pathogen was dependent on the antibiotic concentration used in the media. The minimum antibiotic concentration which successfully prevented the growth of the fungal pathogen was 100 mg/ml. At that concentration, the fungus was only observed on the calli but not on the medium. However, the calli turned brown after 2 weeks of inoculation. In addition, the calli that survived became compacted and failed to regenerate.

¹Alamat sekarang: Jabatan Kejuruteraan Kimia & Proses, Fakulti Kejuruteraan UKM.

²Alamat untuk perhubungan.

³Jabatan Sains Tanah, UPM Serdang.

PENDAHULUAN

Perlakuan pada kultur tisu dengan patogen atau toksin merupakan kaedah pemilihan yang selalu digunakan untuk mendapatkan varian tumbuhan yang resistans kepada penyakit (Daub 1986). Sel-sel yang berjaya melintasi kesan tekanan pemilihan yang diberikan oleh patogen atau toksin dianggap berjaya mengatasi infeksi oleh agen-agen penyakit yang berkenaan (Ingram 1977; Sacristan 1979; Sacristan & Hoffman 1979; Ostry & Skilling 1988). Untuk menghalang perkembangan kulat patogen, Lepoivre *et al.* (1986) telah memasukkan bahan antikulat seperti Benlate^(R) dan Mycostatin ke dalam medium, untuk mengawal perkembangan kulat patogen yang digunakan sebagai agen tekanan pemilihan. Kaedah ini dilaporkan mudah dan berkesan untuk memilih somaklon yang resistans terhadap sesuatu patogen (Brettell & Ingram 1979). Menurut Daub (1986) kerintangan yang ditunjukkan pada planlet adalah berkorelasi dengan kerintangan penyakit pada tumbuhan lengkap.

Satu kajian awalan telah dilakukan untuk menguji keberkesanan kaedah ini untuk memilih secara *in vitro* kultur tisu cili yang resistans terhadap *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler & Bisby. Kulat ini dipilih kerana, semasa kewabakan, penyakit antraknos yang disebabkan olehnya boleh mengurangkan hasil cili sehingga 60% (Kang 1983). Dalam kajian ini agen tekanan pemilihan yang digunakan ialah ekstrak kasar toksin dan konidium patogen yang tersebut di atas. Kaedah *in vitro* ini diharapkan dapat membantu mempercepatkan usaha untuk mendapatkan tumbuhan yang resistans terhadap patogen tersebut.

Untuk menghadkan pertumbuhan patogen pada kultur sel, ekstrak antibiotik dari kulat *Chaetomium trilaterale* Chivers (Ahmad *et al.* 1989) telah digunakan. Dua pencilan kulat antagonis, iaitu AW dan M telah digunakan. Penggunaan ekstrak antibiotik dari *C. trilaterale* ini adalah berdasarkan kajian yang menunjukkan kulat ini mempunyai ciri antagonis yang baik terhadap beberapa kulat patogen (Ahmad *et al.* 1990).

BAHAN & KAEDAH

Penghasilan Kalus Dan Planlet Daripada Hipokotil
Penghasilan kalus dan planlet melalui pengkulturan hipokotil cili, koleksi CDI

(Sudarisman 1991) adalah berdasarkan teknik yang telah dilaporkan oleh Nurina *et al.* (1992). Medium regenerasi planlet adalah medium pepejal MS (Murashige dan Skoog 1962) dengan kombinasi hormon pertumbuhan auksin dan sitokinin, iaitu IAA (asid indolasetik) pada kepekatan 1.0 mg/l dan BA (benziladenina) pada kepekatan 2.5 mg/l. Eksplan hipokotil dikulturkan pada medium regenerasi sebanyak lima eksplan bagi setiap piring Petri. Kultur seterusnya dieramkan pada suhu 26-28°C dalam keadaan bercahaya yang berterusan.

Penyediaan Ekstrak Toksin C. capsici

Turasan kasar toksin *C. capsici* disediakan dengan mengkulturkan patogen tersebut dalam medium cecair (Brettell & Ingram 1979) yang terdiri daripada 10% (v/v) jus V8 dalam air suling. Kultur dieramkan di atas penggongcang mendatar (Labline Shaker Model 3594) dengan kelajuan 200 rpm, pada suhu 30°C selama 20 hari. Seterusnya, kultur itu dituras dengan menggunakan empat lapis kain kasa untuk memisahkan miselium.

Hasil turasan kemudiannya diempar (Sorvall, RC 5B) dengan kelajuan 17,000 rpm, pada suhu 4°C selama 15 minit. Supernatan yang terbentuk adalah larutan bebas sel yang mengandungi toksin *C. capsici*. Hasil turasan tersebut ditetapkan kepada pH 5.8 dan seterusnya disterilkan dengan penuras membran (saiz liang 0.2 µm). Ketoksikan turasan kasar toksin ini diuji, dengan menunjukkan terdapatnya nekrosis pada cakera (6 mm) daun cili, sebelum ianya digunakan sebagai agen tekanan pemilihan dalam medium kultur tisu.

Penyediaan Medium Bertoksin

Kepekatan ekstrak toksin dalam medium MS untuk pemilihan ialah 10%, 20%, 30% atau 40% (v/v). Untuk penyediaan ini, 10, 20, 30 atau 40 ml ekstrak kasar toksin steril yang disediakan seperti di atas dicampurkan kepada 50 ml medium MS (kepekatan dua kali ganda) yang telah disterilkan secara autoklaf. Isipadu air suling tertentu ditambah supaya isipadu menjadi 100 ml. Sebelum percampuran toksin dan medium MS dilakukan, suhu medium diturunkan terlebih dahulu kepada 45°C - 60°C untuk mengelakkan penyahaktifan toksin. Campuran medium MS dan toksin kemudiannya dihomogenkan secukupnya sebelum diagihkan ke dalam piring Petri steril.

JADUAL 1
Pembentukan kalus dan regenerasi planlet daripada eksplan cili yang dikulturkan pada medium pemilihan yang mengandungi ekstrak toksin daripada *Colletotrichum capsici*

Kepekatan toksin/jus	% Pembentukan Kalus ^a			% Regenerasi ^b		
	MS	MS + Toksin	MS + Jus V8	MS	MS + Toksin	MS + V8 Jus
0	98.9	-	-	74.6	-	-
10	-	36.7	83.3 ^c	-	0	60.0
20	-	12.2	81.1 ^c	-	0	55.6
30	-	0	75.6	-	0	48.9
40	-	0	70.0	-	0	43.3

^aDaripada 90 eksplan dalam 3 replikasi.

^bDaripada jumlah eksplan.

^cPerbezaan bererti ($t=0.05$) antara % pembentukan kalus dalam medium mengandungi jus V8 dan medium mengandungi ekstrak toksin.

Sebagai kawalan, pengkulturan juga dilakukan dengan menggunakan medium MS sahaja dan medium MS yang dicampurkan dengan medium cecair jus V8 dalam isipadu yang sama dengan toksin (Jadual 1). Kesemua bahan ditetapkan pHnya kepada 5.8 sebelum ditambah kepada medium. Sebanyak 30 eksplan digunakan bagi setiap perlakuan dan peratus pembentukan kalus dalam medium-medium tersebut dicerap. Kalus yang terbentuk disubkulturkan dalam medium MS tanpa toksin untuk diregenerasikan.

Penyediaan Antibiotik daripada C. trilaterale

Pengekstrakan antibiotik daripada pencilan kulat *C. trilaterale* AW dan M adalah ubahsuaian daripada kaedah yang digunakan oleh Geiger *et al.* (1944). Kulat dikulturkan pada medium PDA dan dieram selama 15-20 hari pada suhu bilik. Pengekstrakan dilakukan sebanyak tiga kali dengan mencampurkan aseton kepada miselium serta medium kultur, dan disimpan semalaman pada suhu 4°C. Hasil ekstrak seterusnya dituras melalui kain kasa dan tiga kali lagi melalui kertas turas Whatman No 1.

Hasil turasan dipekatkan dengan alat pengempar berputar (Tokyo, Rikakikai) pada suhu 55°C selama 2 jam. Seterusnya, pengekstrakan antibiotik dengan etil asetat dilakukan sebanyak dua kali. Lapisan nyahaktif

(bahagian bawah) dibuang dan lapisan aktif (bahagian atas) dipekatkan dengan alat pengewapan berputar pada suhu 60°C, untuk selama 3 jam. Ekstrak yang diberi nama antibiotik AW dan M ini adalah dalam bentuk serbuk.

Pengasaan Keamatan Kesan Antibiotik Terhadap Patogen

Larutan stok berantibiotik (pH 5.8) daripada kulat *C. trilaterale* AW dan M disediakan. Medium regenerasi disterilkan dengan menggunakan penuras membran (saiz liang 0.22 µm). Selepas pengautoklavan pada suhu 121°C selama 20 minit dengan tekanan 25 kg/m³, medium regenerasi disejukkan ke suhu 45-60°C. Kepada medium ini dicampurkan larutan stok berantibiotik untuk mendapatkan kepekatan akhir antibiotik seperti berikut: 0, 1.0, 3.0, 5.0, 10.0, 30.0, 50.0, 100.0 dan 200.0 mg/l. Campuran tersebut dihomogenkan dengan sempurna sebelum diagihkan ke dalam piring Petri steril.

Pengasaan dilakukan untuk menentukan kepekatan optimum antibiotik bagi perencatan sepenuhnya patogen, *C. capsici* pada medium regenerasi. Cakera kulat berdiameter 0.5 cm dikulturkan di tengah piring Petri, dan dieram selama seminggu, di bawah cahaya yang berterusan pada suhu bilik.

Kesan Patogen Terhadap Pembentukan Planlet

Eksplan hipokotil dikultur pada medium regenerasi. Selepas hari ke-10, kalus yang mempunyai saiz seragam disubkulturkan ke medium berantibiotik, AW dan M dengan kepekatan 100 mg/l. Kemudian ampai konidium patogen yang berkepekatan 10^4 konidium/ml diinokulkan pada kalus tersebut. Kultur seterusnya dieramkan pada suhu 26-28°C, di bawah cahaya yang berterusan. Penceraan dilakukan berdasarkan kesan patogen terhadap kemandirian kalus (peratus yang tidak menjadi perang) dan pembentukan planlet.

HASIL

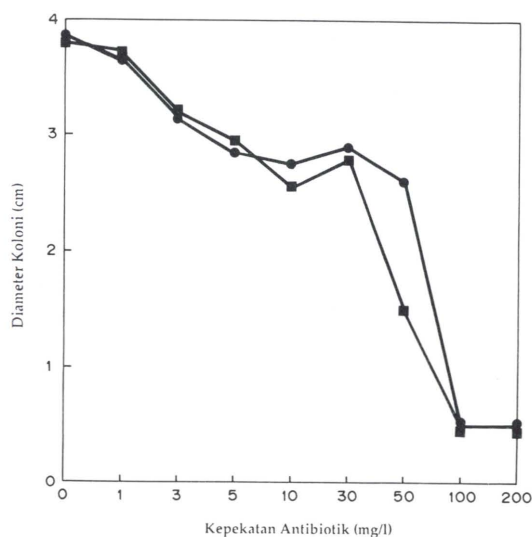
Kesan Toksin Terhadap Pembentukan Kalus

Selepas 2 minggu pengkulturan, cerapan diambil berdasarkan pembentukan kalus dan kematian yang dialaminya. Berdasarkan kepada ANOVA, penggunaan toksin dan jus V8 telah memberikan kesan yang bererti ($kb < 0.05$) terhadap pembentukan kalus berbanding dengan kawalan (Medium MS). Eksplan hipokotil yang dikultur pada medium toksin hanya berjaya membentuk kalus sehingga kepekatan 20% sahaja. Pada kepekatan yang lebih tinggi, tiada kalus yang berjaya terbentuk (Jadual 1). Pengurangan peratus regenerasi ini juga disebabkan oleh kehadiran medium jus V8, penggunaan Jus V8 telah menurunkan keupayaan pembentukan kalus berbanding dengan penggunaan medium MS tanpa sebarang tambahan. Peratus pembentukan kalus adalah 36.7% untuk 10% toksin dan 12.2% untuk 20% toksin. Keupayaan pembentukan kalus juga didapati menurun dengan peningkatan kepekatan jus V8 yang digunakan di dalam medium MS.

Kesemua kalus yang terbentuk pada medium toksin tidak berjaya diaruh bagi pembentukan planlet (Jadual 1). Kalus mula menjadi perang pada bahagian yang bersentuhan dengan medium dan seterusnya diikuti tisu yang bersebelahannya. Kalus yang terbentuk pada medium jus V8 telah diregenerasikan, walaupun kalus yang diperolehi pada kepekatan 30 atau 40% menunjukkan peratus regenerasi yang rendah (Jadual 1). Sementara itu, bagi kalus yang ditanam pada medium MS kawalan, regenerasi telah dapat dihasilkan.

Pengasaan Antibiotik Terhadap Patogen

Diameter cakera miselium kulat *C. capsici* yang berkembang diukur selepas penderaman selama 1 minggu. Peningkatan kepekatan antibiotik didapati mengurangkan diameter koloni kulat yang terbentuk. Sehingga akhirnya, pada kepekatan 100 mg/l, patogen tidak lagi berupaya untuk tumbuh (Rajah 1). Fenomena perencatan perkembangan miselium patogen tersebut berlaku untuk antibiotik daripada kedua-dua pencilan kulat AW dan M. Perbandingan keberkesanan perencatan antara keduanya menunjukkan bahawa pada kepekatan yang sama, antibiotik daripada pencilan M merencat patogen dengan lebih berkesan. Berdasarkan analisis ANOVA, perbezaan keberkesanan perencatan secara keseluruhan antara antibiotik pencilan M dan pencilan AW adalah sangat bererti ($kb < 0.01$).



Rajah 1 : Pengasaan aktiviti ekstrak antibiotik daripada *Chaetomium trilaterale* pencilan AW (●) Dan Pencilan M (■) Terhadap pertumbuhan *C. capsici*, agen penyakit antraknos

Kesan Patogen Terhadap Pembentukan Planlet

Patogen yang diinokulkan pada kalus di atas medium regenerasi berantibiotik telah menginfeksi kalus tersebut tanpa membentuk pertumbuhan yang meluas pada permukaan kalus tersebut. Walau bagaimanapun kalus tersebut tidak berjaya menghasilkan planlet

kerana nekrosis yang berlaku pada sebahagian kalus didapati menjangkiti bahagian yang lain dan seterusnya mengakibatkan kematian kalus. Sebaliknya, kalus yang dikulturkan pada medium regenerasi berantibiotik tanpa penginokulan patogen (iaitu kawalan) didapati berupaya untuk membentuk planlet.

PERBINCANGAN

Kesan Toksin C. capsici Terhadap Pembentukan Kalus

Penambahan toksin *C. capsici* ke dalam medium regenerasi berjaya menekan kecekapan pembentukan kalus daripada eksplan hipokotil. Fenomena ini berlaku kerana kewujudan toksin yang telah mengganggu sistem perkembangan sel dan seterusnya menekan tumbesannya (Ingram 1977). Kegagalan membentuk planlet oleh kalus yang berupaya bermandiri berlaku, mungkin disebabkan oleh perubahan dalam sistem perkembangan sel. Perubahan keperluan nutrien dan kepekatan hormon tumbesaran berlaku akibat perubahan persekitaran (medium) dan tekanan oleh tindakan toksin (Daub 1986). Kegagalan ini juga mungkin boleh diterangkan oleh keadaan fisiologi kalus yang padat. Sel-sel yang telah mati dan mengalami nekrosis akibat tindakan toksin turut mengeluarkan bahan toksik yang boleh merebak ke sel-sel bersebelahan yang bermandiri.

Ujian perbandingan antara medium cecair Jus V8 dan toksin dilakukan untuk menentukan kesan latar belakang medium penghasil toksin terhadap kemandirian sel hakis cili. Penurunan peratus pembentukan kalus yang bererti oleh medium Jus V8 menunjukkan bahawa komposisi medium tersebut mempengaruhi keupayaan pembentukan kalus pada sel-sel cili. Oleh sebab penggunaan jus V8 masih membenarkan berlakunya regenerasi, maka andaian dibuat bahawa medium tersebut boleh digunakan sebagai medium penghasilan toksin untuk ujian pemilihan kalus yang rintang terhadap toksin patogen.

Kesan Antibiotik Terhadap Perkembangan Patogen

Penggunaan kedua-dua antibiotik berjaya merencat sepenuhnya pertumbuhan patogen pada medium regenerasi. Ini membuktikan bahawa antibiotik daripada kedua-dua pencilan kulat mempunyai potensi untuk digunakan bagi

menghalang perkembangan patogen apabila digunakan secara langsung sebagai agen pemilih. Antibiotik daripada pencilan M memperlihatkan keberkesanan perencatan yang lebih tinggi berbanding dengan antibiotik daripada pencilan AW.

Kesan Patogen Terhadap Pembentukan Planlet

Kegagalan kalus membentuk planlet mungkin disebabkan oleh morfologi kalus yang padat, yang memudahkan berlakunya jangkitan atau nekrosis dari sel ke sel. Masalah ini boleh diatasi dengan terbentuknya kalus rapuh yang embrionik supaya sel-sel rintang terhadap patogen boleh bermandiri tanpa dipengaruhi oleh faktor fisiologi tumbuhan seperti yang dialami oleh sel-sel rentan yang berhampiran.

Penggunaan kalus yang padat (walaupun terdapat sel atau tisu yang resistans), menimbulkan masalah semasa memisahkan tisu daripada bahagian yang terinfeksi. Masalah ini mungkin boleh diatasi dengan menggunakan kalus yang longgar atau ampai sel yang embrionik. Hasil daripada kejayaan tersebut boleh membuka jalan dalam penyelidikan bagi mengatasi masalah penyakit pada cili (Fari 1986).

Antibiotik yang dihasilkan oleh *C. trilaterale* boleh dijadikan agen perencatan patogen yang baik di dalam medium pemilihan kerana ia didapati tidak memberi sebarang kesan terhadap penghasilan planlet. Fenomena ini perlu diberi perhatian kerana antibiotik boleh didapati dengan mudah daripada kulat antagonis tersebut. Di samping itu, kejayaan mendapatkan sesuatu kaedah bagi merencat perkembangan patogen di dalam medium akan membuka jalan kepada pemilihan variasi sel yang rintang secara infeksi terus daripada patogen (Sacristan & Hoffman 1979). Mengikut Lepoivre *et al.* (1986) kaedah yang menggunakan patogen sebagai agen tekanan pemilihan dianggap lebih baik daripada kaedah menggunakan toksin. Ini adalah kerana kaedah penggunaan toksin bergantung kepada sama ada toksin adalah faktor virulen sebenar bagi penyakit yang disebabkan oleh patogen tersebut. Bagaimanapun, kaedah menggunakan patogen seperti yang telah dilakukan dalam kajian ini perlu diperbaiki supaya keadaan optimum diperolehi, dan seterusnya dapat digunakan bagi penghasilan tumbuhan yang resistans terhadap penyakit yang disebabkan oleh patogen yang dikaji.

PENGHARGAAN

Kajian ini dibiayai oleh peruntukan IRPA 01-07-03-007

RUJUKAN

- AHMAD, I.B., A.H. ZUBAIDAH, T.S. GOH, K.M. SHANMUGAM, Y.S. ROMLAH, A. NURINA, W.Y.W. MOHTAR & B.D. LAILY. 1989. Biologi *Chaetomium* sp. dan kesan perencatan terhadap pertumbuhan beberapa bakteria. *Sains Malaysiana* **18**: 55-64.
- AHMAD, I.B., A. NURINA, M.B. RATUAH & A.H. ZUBAIDAH. 1990. *In vitro* screening of microorganisms antagonistic to plant pathogens (Abstrak). *Symposium Mikrobiologi Malaysia ke 13*, hlm. 17-18.
- BRETTELL, R.I.S. & D.S. INGRAM. 1979. Tissue culture in the production of novel disease-resistant crop plants. *Biological Reviews* **54**: 329-345.
- DAUB, M.E. 1986. Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **24**: 600-605.
- FARI, M. 1986. Pepper *Capsicum annuum* L. Dalam *Biotechnology in Agriculture and Forestry 2: Crops I*, ed. Y.P.S Bajaj, hlm. 345-362. Berlin. Heidelberg: Springer-Verlag.
- GEIGER, W.B., E.C. JEAN & A.W. SELMAN. 1944. Chaetomin, a new antibiotic substance produced by *Chaetomium cochliodes*. II Isolation and concentration. *Journal of Bacteriology* **48**: 531-536.
- INGRAM, D.S. 1977. Applications in plant pathology. Dalam *Plant Tissue And Cell Culture*, ed. H.E. Street hlm. 463-500. Oxford: Blackwell.
- KANG, L.C. 1983. *Menanam Sayur Keperluan Sendiri*. hlm. 95-99. Kuala Lumpur: Dewan Bahasa dan Pustaka, Kementerian Pelajaran Malaysia.
- LEPOIVRE, P., J. VISEUR, K. DUHEM & N. CARLES. 1986. Double-layer culture technique as a tool for the selection of calluses resistant to toxic material from plant pathogenic fungi. Dalam *Somaclonal Variation and Crop Improvement*, ed. J. Semal hlm. 45-52. Martinus Nijhoff Publishers.
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497.
- NURINA, A., I.B. AHMAD & A.G.A. KARIM. 1992. Penjanaan kalus dan regenerasi planlet dalam kultur tisu cili. *Sains Malaysiana* **21**(3): 157-163.
- OSTRY, M.E. & D.D. SKILLING. 1988. Somatic variation in resistance of populus to *Septoria musiva*. *Plant Disease* **72**: 724-727.
- SACRISTAN, M.D. & F. HOFFMAN. 1979. Direct infection of embryogenic tissue cultures of haploid *Brassica napus* with resting spores of *Plasmodiophora brassicae*. *Theoretical and Applied Genetics* **54**: 129-132.
- SUDARISMAN SUYOKO. 1991. Incorporating resistance against pepper veinal mottle virus (PVMV) and ideal morphoagronomic characters into chilli *Capsicum annuum* L. Masters Thesis, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi.

(Received 15 August 1992)