



UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA

**KAJIAN BIOKIMIA DAN FISILOGI BAGI INTERAKSI DI ANTARA
KOKO DENGAN *ONCOBASIDIUM THEOBROMAE* TALBOT DAN
KEANE**

HAFIZAH BINTI MOHD

FSAS 1998 27

**KAJIAN BOKIMIA DAN FISILOGI BAGI INTERAKSI DI ANTARA
KOKO DENGAN *ONCOBASIDIUM THEOBROMAE* TALBOT DAN
KEANE**

Oleh

HAFIZAH BINTI MOHD

**Tesis yang diserahkan sebagai memenuhi keperluan untuk memperolehi
Ijazah Master Sains di Fakulti Sains dan Pengajian Alam Sekitar
Universiti Putra Malaysia**

Ogos 1998



Untuk:

Ayahanda Muhammad Bin Hj Johari,
Bonda Masnah Binti Ahmad,
abang, kakak dan adik-adik tercinta.

Guru-guru dan semua yang pernah berjasa.

Semoga kehidupan kita sentiasa dilimpahi kebahagiaan
di dunia dan akhirat.



PENGHARGAAN

Al-hamdu lilLah, semerbak kesyukuran saya rafa'kan ke hadrat Ilahi kerana dengan izin-Nya jua dapat saya menyiapkan projek penyelidikan ini. Setinggi penghargaan dan ucapan terima kasih yang tidak terhingga saya tujukan kepada Prof. Madya Dr. Radzali Muse, selaku Pengerusi Jawatankuasa Penyeliaan yang telah meluangkan banyak masa dan perhatian beliau untuk memberi tunjuk ajar, bimbingan, nasihat dan dorongan yang amat bermakna untuk saya meneruskan projek ini sehingga ke penghujung. Sekalung ucapan terima kasih yang tidak terhingga kepada Prof. Dr. Marziah Mahmood selaku ahli jawatankuasa penyeliaan atas nasihat, semangat, bimbingan dan kasih sayang yang tidak berbelah bagi sepanjang saya bekerja di Makmal Biokimia Tumbuhan. Juga tidak ketinggalan ucapan jutaan terimakasih ini saya tujukan untuk Dr. Zainal Abidin Mior Ahmad atas kesudian dan kesungguhan beliau mencurahkan idea, pandangan dan kritikan yang membina sepanjang projek penyelidikan ini dijalankan. Istimewa ucapan terima kasih untuk semua rakan-rakan pelajar siswazah di Makmal 235 dan 230 dan sahabat-sahabat 699 yang sangat banyak membantu dan memberi sokongan moral. Akhir sekali, ucapan terimakasih untuk Universiti Putra Malaysia yang membiayai pengajian saya di bawah Skim Fellow Pasca Siswazah. Juga kepada semua yang pernah berjasa kepada saya sepanjang menjalani pengajian siswazah di Jabatan Biokimia dan Mikrobiologi.

JADUAL KANDUNGAN

Muka Surat

PENGHARGAAN.....	iii
SENARAI JADUAL.....	vii
SENARAI RAJAH.....	viii
SENARAI PLAT.....	xii
SENARAI SINGKATAN	xiv
ABSTRAK.....	xvi
ABSTRACT.....	xix
BAB	
I	
Pengenalan.....	1
Objektif Kajian.....	4
II	
SOROTAN LITERATUR.....	6
Penyakit Mati Rosot Jejalur Vaskular (VSD).....	8
Simptom.....	9
Ciri-ciri Morfologi Patogen.....	11
Pengawalan Penyakit.....	13
Kultur <i>O.theobromae</i>	17
Kultur Tisu Tumbuhan.....	18
Kultur Tisu Koko.....	20
Kajian Interaksi Kulat dan Perumah.....	20
Teknik Dwikultur.....	21
Fitotoksin dalam Penghasilan Penyakit.....	24
Penggunaan Fitotoksin sebagai Agen Pemilihan.....	27
Penghasilan Fitotoksin.....	28
Pengasingan dan Penulinan Fitotoksin.....	29
Bioasai.....	30
III	
BAHAN DAN KAEDAH.....	32
Kultur Tisu Koko.....	32
Percambahan Biji.....	32
Penyediaan Medium Percambahan	32
Penyediaan Medium Pengaruh Kalus.....	33
Pensterilan Permukaan Eksplan.....	34
Pembentukan Kultur Kalus.....	34
Pembentukan Sel Ampaian.....	35
Penjagaan Kalus dan Sel Ampaian.....	35
Penentuan Skor Pengaruh Kalus dan Sel Ampaian.....	36
Penentuan Berat Basah dan Kering.....	36



Kultur <i>O.theobromae</i>	37
Pengasingan <i>O.theobromae</i>	37
Kajian Pertumbuhan <i>O.theobromae</i>	38
Interaksi Dwikultur Kalus Koko dan Miselium	
<i>O.theobromae</i>	41
Interaksi Terus.....	42
Interaksi Bersebelahan.....	43
Interaksi Secara Orientasi Sudut.....	43
Bioaktiviti Kultur Filtrat <i>O.theobromae</i>	48
Penghasilan dan Penyimpanan Kultur Filtrat	
<i>O.theobromae</i>	48
Bioasai Menggunakan Disk Daun.....	48
Bioasai Menggunakan Kultur Tisu.....	51
Analisa Perubahan Fisiologi dan Biokimia Sel dan Tisu Koko...	54
Penabiran Mikroskop Elektron.....	54
Penentuan Viabiliti Kultur Tisu.....	55
Penentuan Jumlah Polifenol Terlarut.....	56
Kandungan Protein Terlarut.....	57
Aktiviti Enzim Peroksidase.....	58
Bioaktiviti CFs pada Biji Benih Sawi (<i>Brassica chinensis</i>).....	59
Penulinan Bahan Fitotoksin daripada CFs dan Bioaktiviti	60
Pengekstrakan.....	60
Kromatografi Turus.....	60
Kromatografi Lapisan Nipis.....	61
Pengekstrakan Miselium <i>O.theobromae</i>	62
Analisa Statistik.....	63
IV KEPUTUSAN.....	64
Kultur Tisu Koko.....	64
Pembentukan Kultur Kalus	64
Pertumbuhan Kalus	69
Pertumbuhan Sel Ampaian.....	70
Kultur <i>O.theobromae</i>	74
Kajian Pertumbuhan <i>O.theobromae</i>	74
Interaksi Dwikultur Kalus Koko dan Miselium	
<i>O.theobromae</i>	77
Interaksi Terus.....	77
Interaksi Bersebelahan.....	91
Interaksi Secara Orientasi Sudut.....	91
Bioaktiviti Kultur Filtrat <i>O.theobromae</i>	96
Bioasai Menggunakan Disk Daun.....	96
Bioasai Menggunakan Kultur Tisu.....	101
Bioaktiviti CFs pada Biji Benih Sawi (<i>Brassica chinensis</i>).....	116
Penulinan Fitotoksin daripada CFs dan Bioaktiviti.....	118
Pengekstrakan.....	118

	Kromatografi Turus.....	120
	Kromatografi Lapisan Nipis	120
	Pengekstrakan Miselium <i>O.theobromae</i>	121
V	PERBINCANGAN.....	126
IV	RINGKASAN.....	144
	RUJUKAN.....	148
	LAMPIRAN.....	165
	VITA.....	169



SENARAI JADUAL

Jadual		Muka Surat
1	Peratus eksplan yang boleh menghasilkan kalus dari klon ICS 95 dan PA 7 per jumlah eksplan yang telah diaruhkan dengan medium agar JCM dan KRM pada suhu $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ di dalam keadaan gelap selepas 4 minggu pengkulturan.....	65
2	Pembentukan kalus koko (klon ICS 95 dan PA 7) dari medium agar (JCM) dan medium Kong dan Rao (KRM).....	67
3	Perkembangan jejari koloni miselium <i>O.theobromae</i> di dalam sistem dwikultur inreraksi secara orientasi sudut bersama kalus koko (unit cm).....	94
4	Pertambahan garis pusat kalus koko (unit cm) selepas 7, 14 dan 21 hari inokulasi dengan <i>O.theobromae</i> di dalam medium agar Jalal dan Collin (1979) pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$	95

SENARAI RAJAH

Rajah		Muka Surat
1	Gambarajah skema menunjukkan kedudukan plug sumber inokula miselium <i>O.theobromae</i> di atas suatu medium agar CCM berusia 5 hari.....	44
2	Gambarajah skema menunjukkan kedudukan kedudukan sistem dwikultur miselium <i>O.theobromae</i> dan kalus koko di atas medium agar Jalal dan Collin (1979) pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$	45
3	Gambarajah skema menunjukkan orientasi sudut kalus koko dan miselium <i>O.theobromae</i> dalam sistem dwikultur di atas suatu medium agar Jalal dan Collin (1979) pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$	46
4	Keluk pertumbuhan kalus koko klon ICS 95 berdasarkan (A) berat basah dan (B) berat kering di dalam suatu medium agar Jalal dan Collin (1979) dan Kong dan Rao (1981) pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ di dalam keadaan terang.....	71
5	Keluk pertumbuhan kalus koko klon ICS 95 di dalam suatu medium agar Jalal dan Collin (1979) di dalam keadaan (A) terang dan (B) gelap pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$	72
6	Keluk pertumbuhan sel ampaian koko di dalam suatu medium Jalal dan Collin (1979) dan Kong dan Rao (1981) berdasarkan (A) berat basah dan (B) berat kering pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ di dalam keadaan terang.....	73
7	Kesan sumber karbon berbeza (i) sukrosa (ii) fruktosa dan (iii) glukosa ke atas pertumbuhan koloni miselium sekunder <i>O.theobromae</i> di atas suatu medium agar (A) Murashige dan Skoog (MSA) dan (B) medium agar Czapek Dox (CDA) yang dieramkan pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 7 hari	78
8	Kesan kepekatan berbeza pengawalatur tumbesaran (A) asid 3-indol butirik (IBA) dan (B) zeatin (ZEA) ke atas pertumbuhan miselium sekunder <i>O.theobromae</i> di atas suatu medium agar MSA (Murashige dan Skoog) pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ selepas pengeraman selama 9 hari.....	79

9	Pertumbuhan <i>O.theobromae</i> di dalam medium cecair 'defined' dan 'undefined' berdasarkan (A) berat basah dan (B) berat kering miselium selepas 3 minggu dikultur pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ dalam keadaan gelap.....	80
10	Perubahan pH kultur filtrat telah ditunjukkan selepas 3 minggu dikultur di dalam medium berbeza pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ dalam keadaan gelap	81
11	Kesan (A) keadaan gelap atau terang serta (B) pegun dan bergoncang pada pertumbuhan miselium <i>O.theobromae</i> di dalam medium air kelapa (CW) selepas 3 minggu pengkulturan pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$	82
12	Kesan sumber inokula <i>O.theobromae</i> berbeza terhadap pertumbuhan kalus koko berdasarkan berat basah (A) dan berat kering (B) selepas 4 minggu di dalam dwikultur pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ di dalam keadaan gelap.....	83
13	Pertambahan jejari koloni miselium <i>O.theobromae</i> di atas kalus koko dari klon berbeza yang dieramkan pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ dalam keadaan gelap	86
14	Pertumbuhan kalus berdasarkan (A) berat basah dan (B) berat kering dari klon PA 7 dan ICS 95 di dalam monokultur (m) dan dwikultur (d) dieramkan pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ di dalam keadaan gelap selepas 4 minggu pengkulturan.....	87
15	Viabiliti kalus di dalam sistem dwikultur dan monokultur berdasarkan penurunan TTC (2,3,5-trifenil tetrazolium klorida) setiap minggu sehingga minggu ke-4 selepas inokulasi	88
16	Penentuan kandungan (A) protein terlarut, (B) jumlah polifenol terlarut dan (C) aktiviti enzim peroksidase pada kalus koko klon yang rintang (ICS 95) dan rentan (PA7) di dalam yang sistem dwikultur (d) dan monokultur (m) selepas 2 minggu inokulasi	89
17	Pertumbuhan miselium <i>O.theobromae</i> (A) dan kalus koko (B) di atas medium Jalal dan Collin (1979) sistem monokultur dan dwikultur (interaksi kalus antara 2 inokula) pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$	93

18	Indeks nekrosis pada disk daun koko klon ICS 95 dan PA 7 selepas didedahkan kepada kultur filtrat (kepekatan 1x) <i>O.theobromae</i> yang disediakan di dalam larutan (A) medium CW dan (B) medium MSA.....	98
19	Kandungan klorofil terlarut (A) dan polifenol terlarut (B) dalam daun koko yang diambil dari klon PA 7 dan ICS 95 selepas 4 hari dirawat dengan kultur filtrat pada suhu $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ dalam keadaan gelap.....	99
20	Kehilangan elektrolit pada disk daun koko selepas 30 min dan 60 min pendedahan kepada CFs <i>O.theobromae</i> (kepekatan 1x) pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$	106
21	Kehilangan elektrolit pada disk daun koko bagi klon ICS 95 dan PA 7 selepas (A) 30 min dan (B) 60 min pendedahan kepada CFs <i>O.theobromae</i> (kepekatan 5x) pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$	107
22	Kesan penambahan CFs di dalam medium terhadap indeks keperangan kalus koko bagi klon PA 7 dan ICS 95 pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 2 minggu pengeraman.....	108
23	Kesan penambahan CFs di dalam medium terhadap viabiliti kalus koko klon PA 7 dan ICS 95 pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 2 minggu pengeraman.....	109
24	Pertumbuhan kalus koko bagi klon (A) PA 7 dan (B) ICS 95 berdasarkan berat kering kalus selama 4 minggu pengkulturan pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ setelah diberi rawatan dengan beberapa titis CFs secara aseptik.....	110
25	Kesan titisan CFs terhadap viabiliti kalus dari klon koko PA 7 dan ICS 95 yang dikultur pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 4 minggu.....	111
26	Kandungan (A) protein terlarut dan (B) aktiviti spesifik enzim peroksidase di dalam kalus koko selepas 4 minggu diberi rawatan CFs	112
27	Kehilangan elektrolit daripada kalus koko klon ICS 95 dan PA 7 setelah diberi pendedahan selama (A) 30 minit dan (B) 60 minit kepada kultur filtrat (kepekatan 5x).....	113
28	Berat kering sel ampaiian selepas 3 minggu dikultur dengan penambahan (A) medium CW dan (B) kultur filtrat pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$	114

29	Kesan haba dan dialisis kultur filtrat terhadap (A) peratus percambahan biji benih , pemanjangan (B) hiperkotil dan (C) radikal biji benih sawi.....	117
30	Kesan aktiviti fitotoksik dari ekstrak kultur filtrat fasa akuas kloroform (A) dan etil asetat (B) pH 3, 7, dan 9 terhadap peratus percambahan biji benih sawi.....	119
31	Kesan aktiviti fitotoksik dari ekstrak kultur filtrat fasa akuas etil asetat yang ditulinkan menggunakan (A) kromatografi turus silika Gel G-60 dan (B) kromatografi lapisan nipis tersedia (pTLC).....	123
32	Bioasai ekstrak kasar miselium <i>O.theobromae</i> menggunakan (A) aseton dan (B) etil asetat terhadap peratus percambahan biji benih sawi.....	124
33	Bioasai ekstrak kasar miselium <i>O.theobromae</i> menggunakan (A) aseton dan (B) etil asetat terhadap pemanjangan hiperkotil dan radikal biji benih sawi.....	125



SENARAI PLAT

Plat		Muka Surat
1	Bintik-bintik hijau pada daun yang kekuningan adalah merupakan simptom penyakit VSD yang ketara pada daun koko.....	12
2	Keratan melintang ranting koko yang terkena jangkitan penyakit VSD menunjukkan jaluran perang pada berkas vaskular yang jelas kelihatan (A), manakala ranting yang sihat tidak menunjukkan kesan jaluran perang (B).....	12
3	Miselium <i>O.theobromae</i> kelihatan keluar dari urat daun koko yang telah dijangkiti oleh penyakit mati rosot jejalur vaskular (VSD) selepas dikultur 48 jam di atas medium agar air ('water agar') pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ di dalam keadaan gelap.....	39
4	Kultur patogen <i>O.theobromae</i> di dalam suatu medium agar MSA selepas 9 hari dieram pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ di dalam keadaan gelap.....	40
5	Kultur patogen <i>O.theobromae</i> di dalam medium cecair CW selepas 3 minggu dieram pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ di dalam keadaan gelap.....	40
6	Kedudukan kalus koko dan <i>O.theobromae</i> di dalam sistem monokultur (A dan C) dan dwikultur (B) di atas suatu medium agar Jalal dan Collin (1979) selepas 12 hari pengeraman.....	47
7	Dwikultur koko kalus klon PA 7 dan <i>O.theobromae</i> pada hari ke-2. Kedudukan kalus koko adalah pada orientasi sudut berbeza manakala inokula kulat diletakkan di tengah-tengah piring petri	47
8	Pertumbuhan kalus koko klon PA 7 pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ di atas suatu medium agar Jalal dan Collin (1979) dengan penambahan CFs (5, 25 dan 50%) selepas 2 minggu dalam keadaan gelap.....	52
9	Pembentukan kalus <i>Theobroma cacao</i> klon ICS 95 dari (A) eksplan daun dan (B) hipokotil telah dieramkan di dalam keadaan gelap pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 4 minggu.....	68



10	Penabiran mikroskop elektron dwikultur kalus koko klon PA7 dan miselium dan <i>O.theobromae</i> selepas 2 minggu pengeraman menunjukkan kolonisasi hifa.....	90
11	Kolonisasi pada kalus koko klon PA7 oleh hifa miselium <i>O.theobromea</i> selepas 3 minggu pengeraman.....	90
12	Penabiran mikroskop elektron menunjukkan permukaan kalus koko klon PA7 yang tidak diberi rawatan dengan CFs kelihatan sihat dan normal.....	115
13	Penabiran mikroskop elektron menunjukkan permukaan kalus koko klon PA7 selepas diberi rawatan dengan CFs kelihatan kemek dan berlaku plasmolisis dengan banyaknya (seperti anak panah).....	115

SENARAI SINGKATAN

BAW	n-butanol : asid asetik : air
BSA	Bovin serum albumin
CCM	'Corticium Culture Medium'
CW	Medium air kelapa
CDA	Agar Czapek Dox
CFs	Kultur filtrat
EtOH	Etanol atau etil alkohol
FRU	Fruktosa
GLU	Glukosa
IBA	Asid 3-indol butirik
JCM	Medium Jalal dan Collin
KIN	Kinetin
KRM	Medium Kong dan Rao
MSA	Agar Murashige dan Skoog
MARDI	Institut Penyelidikan dan Pembangunan Pertanian Malaysia
NAA	Asid 1-naftelen asetik
PDA	Agar dektrosa kentang
p.p.m	Satu bahagian per sejuta ($\times 10^{-6}$)
p.s.i	Paun per inci persegi
PVP	Polivinil pirolidon
pTLC	Kromatografi lapisan nipis tersedia
TTC	2, 3, 5-trifenil tetrazolium klorida
Tris	Hidroksimetil aminometan

UV	Ultra violet
UPM	Universiti Putra Malaysia
VSD	Vascular-Streak Dieback (Mati Rosot Jejalur Vaskular)
WA	Medium agar air (‘Water agar’)
ZEA	Zeatin

Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Putra Malaysia sebagai memenuhi syarat untuk mendapatkan ijazah Master Sains.

**KAJIAN BOKIMIA DAN FISILOGI BAGI INTERAKSI DI ANTARA
KOKO DENGAN *ONCOBASIDIUM THEOBROMAE*
TALBOT DAN KEANE**

Oleh

HAFIZAH BINTI MOHD

Ogos 1998

Pengerusi: Profesor Madya Radzali Muse, Ph.D.

Fakulti: Sains dan Pengajian Alam Sekitar

Penyakit mati rosot jejalar vaskular (VSD) merupakan salah satu penyakit koko yang serius disebabkan oleh sejenis kulat sistemik, *Oncobasidium theobromae* Talbot dan Keane. Kulat ini menghasilkan basidiospora yang menyebabkan jangkitan pada cetusan daun yang masih muda dan sihat, tumbuh dengan cepat di dalam salur zailam, seterusnya menyebabkan kematian pada pucuk dan anak semaian sekiranya hifa sampai ke bahagian batang utama.

Objektif utama projek ini ialah untuk mengkaji beberapa aspek interaksi fisiologi dan biokimia di antara hos (koko) dan patogen (*O.theobromae*) menggunakan teknik dwikultur di dalam keadaan *in vitro*. Pada awal kajian, untuk melakukan teknik dwikultur, keadaan kultur yang mungkin mempengaruhi pertumbuhan isolat *O.theobromae* telah dikaji di dalam medium agar yang sesuai untuk pertumbuhan kalus.

Kajian interaksi telah dilakukan di dalam sistem dwikultur di antara isolat kultur tulin miselium *O. theobromae* dan kalus koko yang berbeza kerintangan terhadap VSD. Kalus yang telah diinokulasi dengan *O.theobromae* menunjukkan kolonisasi intersel dan intrasel yang ekstensif dan seterusnya menyebabkan

terjadinya kesan keperangan. Kerintangan pada kalus telah ditunjukkan dengan kadar kolonisasi yang lebih lambat dan sedikit oleh patogen.

Kultur filtrat (CFs) *O.theobromae* yang berkemungkinan mengandungi fitotoksin telah dihasilkan dengan menginokulat miselium patogen tersebut di dalam medium yang mengandungi 50% (v/v) air kelapa dan dieramkan pada $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ di dalam keadaan gelap selama 21 hari. Kehadiran fitotoksin di dalam CFs kemudiannya telah diuji dengan beberapa siri bioasai ringkas dengan tisu dan sel koko dan spesies lain seperti biji benih *Brassica chinensis*, yang biasa digunakan untuk ujian aktiviti fitotoksik.

Kalus dan sel ampaian koko yang telah diaruhkan dari eksplan hipokotil klon koko yang rentan dan rintang telah dikaji tindakbalasnya menggunakan CFs mentah yang berbeza kepekatannya. Kesan perang, pertumbuhan dan viabiliti pada kalus turut ditentukan. CFs telah didapati menyebabkan kesan perang (nekrosis), merencat pertumbuhan dan mengurangkan viabiliti pada kalus dan sel ampaian koko. Kadar kehilangan elektrolit pada disk daun dan kalus koko turut meningkat apabila didedahkan ke dalam CFs. Kesan yang berbeza antara klon yang rentan dan rintang terhadap VSD turut ditunjukkan apabila dibioasai dengan CFs patogen tersebut.

Percambahan biji benih *B. chinensis* di dalam CFs telah didapati kurang berbanding dengan kawalan. CFs masih lagi menunjukkan aktiviti toksik selepas diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 minit, ini menunjukkan ianya mempunyai sifat yang tahan haba. Aktiviti toksik berkurang setelah CFs didialisis, menunjukkan bahawa fitotoksin adalah berkemungkinan terdiri dari bahan yang mempunyai berat molekul yang rendah. Kompoun fitotoksik juga didapati larut sedikit atau tidak larut di dalam pelarut organik polar dan bukan polar, tetapi ianya

didapati sangat larut di dalam air. Pada kromatografi lapisan nipis tersedia, 4 spot telah dihasilkan menunjukkan warna floresen apabila dilihat di bawah cahaya ultra violet pada λ 365 nm. ini kemungkinan disebabkan oleh kehadiran gegelang aromatik yang mempunyai ikatan dubel di dalam molekul tersebut. Aktiviti toksik tidak terdapat pada ekstrak dari miselium yang diambil dari kultur medium cecair.

Kesimpulan dari kajian ini, walaupun kajian yang lebih mendalam masih diperlukan, teknik dwikultur antara koko dan patogen dan penggunaan CFs boleh menjanjikan suatu aplikasi yang sangat berguna di dalam penyaringan klon-klon koko yang rintang terhadap VSD.

Abstract of thesis presented to the Senate of Universiti Putra Malaysia in fulfilment of the requirements for the degree of Master Science.

PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF INTERACTION BETWEEN COCOA AND *ONCOBASIDIUM THEOBROMAE* TALBOT AND KEANE

By

HAFIZAH BINTI MOHD

August 1998

Chairman: Associate Professor Radzali Muse, Ph.D.

Faculty: Science and Environmental Studies

Vascular-streak dieback (VSD) is a severe disease of cocoa caused by a systemic fungus, *Oncobasidium theobromae* Talbot and Keane. The fungus produced basidiospore that caused infection into young and healthy leaves, grows vigorously in the xylem vessel, leading to shoot and seedling death if hyphae penetrated into the main stem.

The aim of this project is to investigate the aspects of physiological and biochemical interactions between the host (cocoa) and pathogen (*O.theobromae*) using *in vitro* dualculture technique. Initially, an attempt to develop the dualculture technique, cultural conditions which influenced the growth of isolates of *O. theobromae* on agar medium suitable for supporting callus growth were determined.

Interaction between *O.theobromae* and cocoa calli being different in resistance to VSD disease in dualculture system was investigated. Callus inoculated with *O.theobromae* was extensively colonised by intercellular and intracellular hyphae and caused browning responses. Resistance in the callus tissue was associated with slow colonization and limited pathogen mycelial growth.

Culture filtrates (CFs) of *O.theobromae* probably contained phytotoxin produced by inoculating mycelial fungus in a medium containing 50% coconut milk and incubated at $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ in the darkness for 21 days. Cell free CFs were tested for the presence of phytotoxin with several series of simple bioassays with tissues and cells of cocoa and other species. *Brassica chinensis* seeds, which is regularly used for the test of cytotoxic activity.

Cocoa calli and cell suspension cultures derived from hypocotyl explants of a susceptible and resistant cocoa clones were evaluated for their response to different concentrations of crude CFs. The browning effect, growth and viability of the callus were determined. The CFs caused browning, inhibited the growth and reduced the viability of both callus and cell suspensions. Electrolyte leakage from leaf discs and cocoa callus tissue were also increased after a brief exposure to CFs. Different effects were observed on genotypes which were resistant or susceptible to VSD disease when bioassayed with CFs of pathogen.

Germination of the *B. chinensis* seeds in the CFs was less than in the untreated controls. The toxic CFs still had activity after being autoclaved at 121°C for 15 mins. It was indicated that they had a thermostable nature since they also reduced *B. chinensis* seed germination. The toxic activity was reduced after it was dialysed, suggesting that it contained low molecular weight substances. Phytotoxic compounds found insoluble in polar and nonpolar organic solvent, but highly soluble in water. Preparative thin-layer chromatography yielded 4 spots, which is fluoresced when observed under ultra violet light at λ 365 nm, may suggest the presence of aromatic rings with double bonds in the molecules. Toxic activity was not clearly detected in extracts prepared from fungal mycelium removed from the liquid culture medium.

It is concluded that although further additional research is still required, dualculture techniques between cocoa and pathogen as well as using CFs provided promising results as a tool for screening cocoa clones for resistance to VSD.

BAB 1

PENGENALAN

Koko atau nama saintifiknya *Theobroma cacao* L. adalah suatu tumbuhan dikotiledon peringkat tinggi daripada famili Sterculiaceae. Ia merupakan sejenis tumbuhan tropika yang mempunyai keunikan dan keistimewaan yang tersendiri yang menarik minat ramai ahli sejarah dan ahli antropologi membuat kajian, terutama tentang peranannya dalam ekonomi dan sosial penduduk awal Amerika (Cuatrecasas, 1964).

Bahagian terpenting daripada pokok koko ialah bijinya. Biji koko kaya dengan kanji (15%), protein (15%), dan lemak (50%). Koko juga mempunyai minyak yang meruap yang boleh memberikan perisa, 1.5-3% theobromin iaitu sejenis alkaloid purina yang boleh bertindak sebagai bahan perangsang. Kafin dan tanin juga telah ditemui di dalam biji koko disamping sedikit asid malik, asid tartarik, asparagin dan kolin.

Biji koko telah menjadi suatu bahan penting dalam industri pembuatan coklat dan minuman ringan. Lemak koko pula telah digunakan sebagai ramuan dalam industri kosmetik dan farmasiutikal. Ekstrak koko dan theobromin telah

digunakan dalam bidang bio-perubatan kerana ianya mempunyai ciri-ciri kardiouik dan dieuretik.

Di dalam genus *Theobroma* terdapat 21 spesies yang tersebar luas di seluruh dunia, tetapi hanya *Theobroma cacao* L. sahaja spesies yang mempunyai nilai ekonomi dan telah ditanam secara meluas.

Koko telah dipercayai berasal dari daerah sekitar Lembah Sungai Amazon di Brazil. Ianya didapati tumbuh liar di keseluruhan bahagian Hutan Lembah Amazon dan tersebar ke bahagian tengah Amazon-Guayana serta bahagian barat daya dan barat laut selatan Mexico. Ianya telah ditanam oleh orang Maya di Amerika Tengah sebelum kedatangan orang Eropah lebih kurang 2, 000 tahun dahulu. Tanaman koko di Asia Tenggara telah diperkenalkan oleh orang Sepanyol pada abad ke-17 Masihi di Filipina. Tanaman ini kemudiannya telah dibawa ke Indonesia dan Sabah (Utara Borneo) pada awal abad ke-18.

Penanaman koko di Malaysia telah diusahakan oleh Jabatan Pertanian pada tahun 1934 di Serdang di atas plot percubaan seluas $\frac{1}{2}$ ekar yang menggunakan bahan tanaman daripada jenis Trinitario. Beberapa plot percubaan seterusnya telah dibuka antaranya ialah di Cheras, Kuala Lipis dan Temerloh (Faulknew dan Milson, 1938).

Walaupun percubaan awal kurang berjaya, namun percubaan seterusnya telah menunjukkan suatu hasil yang agak memuaskan. Penanaman koko seterusnya semakin berkembang setelah tamat Perang Dunia Ke-2. Antara tahun

1947-1950 beberapa buah estet getah telah ditanam dengan koko di plot-plot yang kecil dengan benih koko yang dibekalkan oleh Jabatan Pertanian. Pada tahun 1950-an penanaman koko secara komersil telah diusahakan di Jerangau, Terengganu. Jabatan Pertanian telah membuka sebuah Stesen Penyelidikan di Jerangau dan ianya telah berkerjasama dengan Stesen Penyelidikan di Serdang. Pada mulanya bahan tanaman yang digunakan adalah daripada jenis Trinitario tetapi kemudiannya, pada tahun 1953 bahan tanaman daripada jenis Amelonado telah diperkenalkan.

Penanaman koko telah diperkenalkan ke Sabah pada tahun 1950-an. Koko daripada jenis Amelonado yang telah dibawa dari Afrika Barat ke Semenanjung Malaysia telah mula ditanam di Tawau. Penubuhan stesen penyelidikan di Quinon Hill, Tawau, Sabah pada tahun 1957 sangat bermakna dalam industri penanaman koko di Malaysia, terutamanya dalam usaha meninggikan mutu dan hasil koko negara. Keluasan tanaman koko telah meningkat daripada 577 hektar pada tahun 1960 kepada 108, 111 hektar pada tahun 1980, seterusnya meningkat kepada 160, 000 hektar pada tahun 1990. Perkembangan penanaman koko di negara ini telah membantu mempelbagaikan pengeluaran hasil pertanian disamping meningkatkan hasil pendapatan para petani.

Pengeluaran koko dunia untuk musim 1995/1996 telah dianggarkan sebanyak 2.71 tan matrik meningkat 12% berbanding dengan musim 1994/1995. Negara pengeluar utama koko ialah Co d'Ivoire (1.07 juta tan matrik), Ghana (355, 000 tan matrik), Brazil (255, 000 tan matrik), Indonesia (285, 000 tan