

Saringan penyakit hawar daun keladi secara in vitro menggunakan esei kepingan daun terpisah (In vitro taro leaf blight screening using a detached leaf assay)

Nor Asiah Ismail, Nurul Ammar Illani Jaafar, Zulhairil Ariffin, Maya Izar Khaidizar, Nuradni Hashim, Hamizan Abdul Jalil dan Umikalsum Mohamed Bahari

Pengenalan

Keladi atau nama saintifiknya *Colocasia esculenta* (L.) Schott adalah antara spesies tanaman makanan ruji bagi masyarakat di rantau Asia Pasifik seperti Fiji, Papua New Guinea, Palau dan Filipina. Di Malaysia keladi merupakan salah satu tanaman alternatif yang mempunyai kandungan kanji yang tinggi. Keseluruhan bahagian tumbuhan termasuk ubi, rizom, batang, daun dan bunga boleh dimakan dan mengandungi kanji yang tinggi. Pengeluaran keladi di Malaysia pada 2018 adalah sebanyak 4,641 tan dan nilai ini amatlah kecil jika dibandingkan dengan pengeluaran ubian lain seperti ubi kayu dan ubi keledek. Bagi memenuhi permintaan pengguna di Malaysia, ubi keladi diimport dari China dan Thailand dengan nilai import masing-masing sebanyak 3,041,430 kg dan 1,665,820 kg. Ini menunjukkan terdapat permintaan yang agak tinggi bagi sayuran keladi di Malaysia.

Berdasarkan kajian sosioekonomi Malaysia, keladi amat berpotensi untuk diketengahkan kerana mampu meningkatkan pendapatan para petani yang menanamnya di halaman rumah dan kebun. Di Malaysia, keladi ditanam di tepi paya, kawasan teres bersaliran dan/ atau di atas tanah kering untuk kegunaan harian dan pasaran tempatan. Ubi keladi kaya dengan kanji dan digunakan sebagai sayur-sayuran. Di samping itu, tanaman ini mempunyai nilai perubatan yang boleh mengurangkan tuberkulosis, ulser, paru-paru berair dan jangkitan kulat. Nilai pemakanan keladi pula adalah lebih tinggi berbanding dengan tanaman ubian lain berdasarkan kandungan protein, mineral, serat, fosforus dan besi. Ubi keladi juga digunakan dalam pelbagai industri untuk penyediaan sirap tinggi fruktosa dan alkohol.

Tanaman keladi juga tidak terkecuali daripada ancaman perosak serta penyakit dan mudah dijangkiti oleh 10 jenis penyakit serta perosak utama di serata dunia. Antara penyakit tersebut adalah penyakit hawar daun atau 'taro leaf blight' (TLB) yang berpunca daripada kulat *Phytophthora colocasiae* yang merupakan ancaman utama tanaman keladi. Penyakit ini akan mengurangkan kawasan daun untuk proses fotosintesis dan juga bilangan daun berfungsi yang lain. Keadaan ini boleh mengurangkan hasil ubi sehingga 50% dan daun sehingga 95% bagi varieti yang mudah dijangkiti. Serangan penyakit ini boleh

menyebabkan kualiti ubi merosot. Selain itu, reput batang juga boleh berlaku disebabkan pengurangan kawasan daun bagi tanaman yang berpenyakit. Dalam keadaan tertentu, hasil tuaian ubi yang telah dijangkiti penyakit akan menyebabkan kerugian besar semasa proses penyimpanan.

Penyakit hawar daun dikenal pasti melalui kemunculan bintik kecil berwarna perang pada permukaan atas daun dan terdapat titisan air pada permukaan bawah. Jangkitan sering bermula di bahagian tepi daun di mana pengumpulan air berlaku. Kemudian bintik-bintik akan membesar berbentuk tidak sekata berwarna perang dengan tepi berwarna kuning. Bintik-bintik awal ini seterusnya menjadi jangkitan sekunder dan seterusnya boleh menyebabkan kematian.

Pelbagai pendekatan telah digunakan untuk menangani penyakit hawar daun termasuk tanaman giliran dan penggunaan racun kulat. Walaupun racun kulat berasaskan metalaxyl terbukti berkesan, kewujudan penyakit semasa musim hujan menyebabkan ia tidak boleh dimakan kerana aplikasi racun kulat yang terlalu banyak dan kerap. Tambahan pula, racun kulat boleh menimbulkan risiko rintang kepada patogen terutama dalam populasi yang tinggi potensi evolusi seperti *P. colocasiae*. Penggunaan varieti yang resisten dianggap sebagai kaedah terbaik untuk pengurusan penyakit. Saringan secara in vitro menggunakan kaedah kepingan daun terpisah (*detached leaf*) boleh dijalankan untuk mengenal pasti aksesori keladi yang rintang terhadap *P. colocasiae*. Kaedah ini telah digunakan untuk saringan pantas tanaman tomato dan germplasma padi terhadap kerintangan penyakit. Manakala, terdapat kajian kerintangan penyakit pada tanaman keladi dijalankan menggunakan elisitor glukon pada dinding sel dan kultur spora pada kepingan daun.

Kaedah kepingan daun terpisah merupakan teknik in vitro yang mudah dan boleh digunakan untuk saringan kerintangan penyakit yang berpunca daripada pelbagai patogen dan serangga. Tisu daun segar diletakkan ke atas medium kultur dan diinokulasi dengan patogen atau perosak berkaitan. Sampel daun yang diperlukan untuk setiap esei kepingan daun terpisah adalah agak kecil iaitu sekitar 5 cm²/keping. Kaedah ini dapat menyaring sejumlah besar genotip dengan cepat di dalam kawasan yang agak kecil, dalam keadaan terkawal dan menjimatkan ruang serta sumber tanaman.

Pemencilan patogen *P. colocasiae*

Patogen kulat *P. colocasiae* dipencilkan daripada daun keladi yang telah dijangkiti penyakit hawar. Sampel daun keladi diambil daripada germplasma keladi di MARDI Serdang (*Gambar 1*).

Sampel daun keladi yang dijangkiti penyakit akan dibasuh dengan larutan clorox 10% dan diikuti dengan alkohol 70% serta tiga kali basuhan air suling yang telah disterilkan (*Gambar 2*).

Sampel yang telah dibersihkan dan dipotong akan dipindahkan secara aseptik ke dalam piring petri medium *potato dextrose agar* (PDA) dan diinkubasi selama 3 – 15 hari untuk pertumbuhan miselium.

Patogen yang telah dipencilkan dikenal pasti sebagai *P. colocasiae* berdasarkan ciri morfologi secara makroskopik di atas medium pertumbuhan dan secara mikroskopik melalui mikroskop (*Gambar 3*). Patogen ini akan diidentifikasi dengan lebih terperinci menggunakan teknik molekular melalui tindak balas analisis *Polymerase chain reaction* (PCR) bagi menentukan nama spesies.



Gambar 1. Germplasma keladi di MARDI Serdang



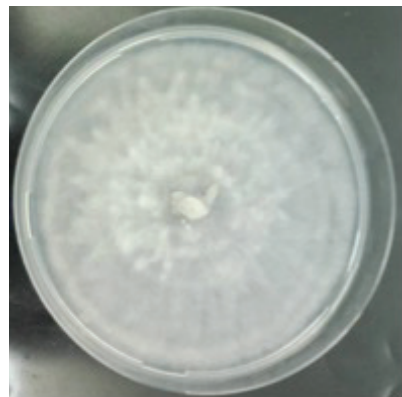
Gambar 2. Daun keladi yang mempunyai simptom hawar daun

Penyediaan sampel tanaman keladi

Sebanyak 12 aksesi keladi (*Jadual 1*) telah ditanam di dalam rumah kaca MyGenebank Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran MARDI (*Gambar 4*). Sampel daun keladi pada usia yang sama telah diambil untuk eksperimen kepingan daun terpisah secara *in vitro*.

Penyediaan zoospora

Isolat *P. colocasiae* diinkubasi pada suhu 24 °C dengan cahaya selama 10 jam pada hari pertama. Air suling steril ditambahkan pada kultur berusia 15 hari sebelum didedahkan pada suhu 100 °C selama 30 minit untuk merangsang pembebasan zoospora daripada sporangia. Kepekatan spora dicairkan kira-kira 15 minit setelah pendinginan hingga 1 µL titisan yang dilihat di bawah mikroskop mengandungi purata lima hingga tujuh zoospora.



Gambar 3. Kulat P. colocasiae tumbuh di atas medium PDA pada hari ke-15

Penyediaan inokulum

P. colocasiae telah ditumbuhkan menggunakan medium PDA dan disimpan di tempat gelap pada suhu 25 °C selama 15 hari.

Jadual 1. Aksesori keladi untuk saringan penyakit hawar daun

Bil.	Aksesori keladi
1.	Hitam
2.	Perang A28
3..	Merah 60
4.	Cina A16
5.	Kemumu
6.	Hitam B
7.	Putih 26
8.	Putih I
9.	Johor
10.	Minyak C7
11.	Mawar B2
12.	Wangi



Gambar 4. Aksesori keladi yang ditanam untuk saringan

Air suling steril dimasukkan ke dalam kultur yang berusia 15 hari dan seterusnya spora dimasukkan ke dalam botol 1 mL. Kepekatan spora diselaraskan dengan air suling steril dan bilangan spora dihitung menggunakan *haemocytometer* di bawah mikroskop.

Saringan penyakit hawar daun

Daun keladi dipotong dalam ukuran 5 cm x 5 cm dan permukaannya disteril menggunakan sodium hipoklorit 0.8% untuk satu minit diikuti bilasan dengan air suling steril sebanyak tiga kali. Setiap kepingan daun terapung di atas air suling steril diinokulasi dengan 50 μ L zoospora dan disimpan di dalam gelap selama empat hari (*Carta alir 1*). Untuk menilai kesan kepadatan inokulum ke atas perkembangan penyakit, zoospora pada kepekatan berbeza (10^6 cfu dan 10^4 cfu) telah diinokulasi ke atas setiap aksesori keladi. Eksperimen kawalan terdiri daripada kepingan daun yang telah diinokulasi dengan air suling steril. Kepingan daun diperiksa secara visual setiap hari dan data peratusan indeks penyakit direkodkan selepas empat hari. Aksesori keladi telah dikelaskan kepada empat skala penilaian (0 – 4) berdasarkan kawasan lesi pada daun (*Jadual 2*).

Peratusan indeks penyakit (PDI) dinilai mengikut formula berikut:

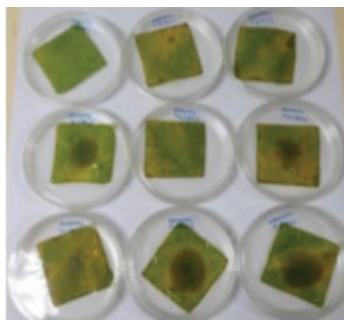
$$\text{PDI} = \frac{\text{Jumlah skor numerical}}{\text{Jumlah bilangan daun direkodkan} \times \text{Skor maksimum}} \times 100$$



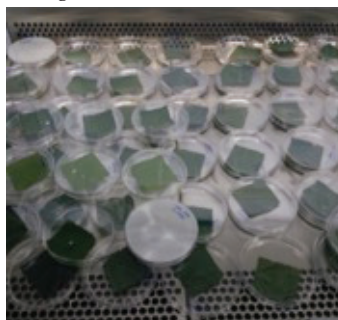
Permukaan daun 5 cm x 5 cm disteril menggunakan sodium hipoklorit 0.8%



50 μ L larutan zoospora diinokulasi ke atas kepingan daun yang terapung di atas air suling steril



Perkembangan jangkitan penyakit direkodkan selepas empat hari



Kepingan daun disimpan di dalam gelap pada suhu 25 °C selama empat hari

Carta alir 1. Eksperimen *in vitro* untuk saringan penyakit hawar daun

Jadual 2. Skala penilaian penyakit hawar daun untuk saringan aksesori keladi

Skala	Ciri-ciri simptom	PDI	Tindak balas penyakit
0	Tiada simptom	0	Imun (I)
1	1 – 20% kawasan lesi	1 – 20%	Rintang (R)
2	21 – 40% kawasan lesi	21 – 40%	Mudah dijangkiti (S)
3	41 – 60% kawasan lesi	41 – 60%	Sederhana mudah dijangkiti (MS)
4	>60% kawasan lesi	61 – 100%	Sangat mudah dijangkiti (HS)

Semua aksesori yang disaring menunjukkan perbezaan yang signifikan (*Jadual 3*). Simptom penyakit kelihatan seawal satu hari selepas inokulasi dan berbeza-beza antara aksesori berdasarkan tahap kerintangan atau genetik masing-masing. Kawasan lesi kelihatan berwarna hitam, perang atau kuning dan berkembang dalam bentuk bulatan. Tindak balas penyakit oleh kulat *P. colocasiae* ke atas 12 aksesori keladi pada kepekatan 10^4 cfu dan 10^6 cfu menunjukkan lima aksesori, Hitam B (PDI 100, 100), Minyak C7 (PDI 87, 80), Johor (PDI 100, 100), Wangi (PDI 93, 93) dan Mawar B2 (PDI 92, 75) adalah sangat mudah dijangkiti (HS) manakala dua aksesori iaitu Perang (PDI 53, 53) dan

Jadual 3. Peratusan indeks penyakit (PDI) aksesori keladi terhadap *P. colocasiae*

Bil.	Aksesori	PDI (%)				R3 (kawalan)
		R1 (10 ⁶ cfu)	Kumpulan tindak balas	R2 (10 ⁴ cfu)	Kumpulan tindak balas	
1.	Hitam B	100	HS	100	HS	0
2.	Cina A16	73	HS	53	MS	0
3.	Minyak C7	87	HS	80	HS	0
4.	Johor	100	HS	100	HS	0
5.	Perang	53	MS	53	MS	0
6.	Merah 60	47	MS	40	S	0
7.	Hitam	60	MS	47	MS	0
8.	Kemumu	25	S	17	R	0
9.	Wangi	93	HS	93	HS	0
10.	Mawar B2	92	HS	75	HS	0
11.	Putih 26	75	HS	50	MS	0
12.	Putih I	67	HS	33	S	0

Nota: Peratusan Indeks Penyakit (PDI), Rawatan 1 (R1), Rawatan 2 (R2), Rawatan 3 (R3), *Highly Susceptible* (HS) (sangat mudah dijangkiti), *Moderate Susceptible* (MS) (sederhana mudah dijangkiti), *Susceptible* (S) (mudah dijangkiti), *Resistance* (R) (rintang)

Hitam (PDI 60, 47) menunjukkan tindak balas sederhana mudah dijangkiti (MS). Walau bagaimanapun, lima aksesori iaitu Cina A16 (PDI 73, 53), Merah 60 (PDI 47, 40), Kemumu (PDI 25, 17), Putih 26 (PDI 75, 50) dan Putih I (PDI 67, 33) menunjukkan tindak balas berbeza pada dua kepekatan yang berlainan. Cina A16 dan Putih 26 menunjukkan peningkatan peratusan indeks penyakit (PDI) iaitu masing-masing daripada 53% dan 50% (sederhana mudah dijangkiti) kepada 73% dan 75% (sangat mudah dijangkiti) apabila kepadatan inokulum ditingkatkan daripada 10⁴ cfu kepada 10⁶ cfu zoospora. Manakala, nilai PDI Putih I dan Merah 60 masing-masing meningkat daripada 33% (mudah dijangkiti) kepada 67% (sangat mudah dijangkiti) dan 40% (mudah dijangkiti) kepada 47% (sederhana mudah dijangkiti). Kemumu menunjukkan potensi rintang terhadap *P. colocasiae* pada kepekatan 10⁴ cfu iaitu 17% PDI, manakala pada 10⁶ cfu nilai PDI meningkat kepada 25% (mudah dijangkiti).

Keputusan eksperimen menunjukkan kepekatan zoospora yang berlainan boleh membezakan antara aksesori yang rintang dan mudah dijangkiti dengan lebih berkesan. Ini menunjukkan peningkatan kepekatan zoospora mempunyai kesan signifikan ke atas perkembangan penyakit. Kajian lain melaporkan hasil yang sama dalam kajian mereka iaitu peningkatan diameter kawasan lesi ke atas daun keladi adalah selari dengan peningkatan kepekatan spora.

Kaedah yang dilakukan dalam eksperimen ini adalah sangat berkesan dalam mengelaskan aksesori keladi mengikut tahap ketahanan masing-masing terhadap *P. colocasiae*. Kepingan daun mula menunjukkan simptom jangkitan penyakit seawal 24 – 48 jam dan selepas empat hari inokulasi. Terdapat perbezaan yang signifikan antara aksesori-aksesori yang disaring.

Kesimpulan

Aksesori keladi dengan peningkatan rintangan terhadap *P. colocasiae* boleh digunakan sebagai sebahagian daripada pendekatan bersepadu untuk pengurusan hawar daun. Selain itu, kaedah saringan aksesori atau kultivar juga dapat meminimumkan kerugian yang berkaitan dengan penyakit hawar daun. Saringan in vitro menggunakan esei kepingan daun terpisah ini merupakan kaedah yang efisien dalam membezakan aksesori keladi berdasarkan kerintangan terhadap *P. colocasiae*. Walaupun kaedah yang dinyatakan adalah standard untuk penyakit hawar daun keladi, namun kaedah ini mungkin dapat diperluas dengan mudah ke atas sistem penyakit lain yang melibatkan *Phytophthora* spp.

Penghargaan

Penulis ingin menyampaikan penghargaan kepada MARDI melalui Projek Pembangunan RMK-11 di bawah Ketua Projek Dr. Rozlaily Zainol dan Ketua Subprojek Pn. Umikalsum Mohamed Bahari untuk peruntukan bagi kajian yang dijalankan.

Bibliografi

- Foolad, M.R., Ntahimpera, N., Christ, J.B. dan Yin, G.Y. (2000). Comparison of field, greenhouse, and detached-leaflet evaluation of tomato germplasm for early blight resistance. *Plant Disease* 84: 967 – 972
- Ivancic, A. dan Lebot, V. (2000). The genetic and breeding of taro. The French Agricultural Research Centre for International Development (CIRAD): France, m.s. 124 – 129
- Jia, Y., Valent, B. dan Lee, F.E. (2003) Determination of host responses to *Magnaporthe grisea* on detached rice leaves using a spot inoculation method. *Plant Disease* 87: 129 – 133
- Misra, R.S. Sharma, K. dan Mishra, A.K. (2008). *Phytophthora* leaf blight of Taro (*Colocasia esculenta*) – A Review. *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology* 2(2): 55 – 63
- Nath, V.S., Hegde, V.M., Jeeva, M.L., Misra, R.S., Veena, S.S., Raj, M. dan Sankar, D.S. (2014). Morphological, pathological and molecular characterization of *Phytophthora colocasiae* responsible for taro leaf blight disease in India. *Phytoparasitica* 43: 21 – 35
- Nelson, S., Brooks, F. dan Teves, G. (2011). Taro Leaf Blight in Hawaii; Plant Disease Bulletin No. PD-71; University of Hawaii: Manoa, HI, USA.
- Padmaja, G., Uma Devi, G., Mahalakshmi, K. dan Sridevi, D. (2016). In vitro screening of taro varieties against *Phytophthora* leaf blight disease. *Journal of Root Crops* 42(1): 57 – 60

- Sahoo, M.R., Dasgupta, M., Mukherjee, A., Sahoo, A.K. dan Kole, P.C. (2005). In vitro screening and characterization of taro for *Phytophthora* leaf blight disease. *Journal of Mycopathological Research* 43: 87 – 90
- Sharma, K., Mishra, A.K. dan Misra, R.S. (2008). The genetic structure of *C. esculenta*: A comparison of RAPD and isozyme markers. *Plant Biotechnology Reports* 2: 191 – 198

Ringkasan

Keladi (*Colocasia esculenta*) merupakan sejenis tanaman umbisi yang amat mudah terdedah kepada penyakit hawar daun yang disebabkan oleh kulat *Phytophthora colocasiae*. Saringan secara in vitro menggunakan kaedah kepingan daun terpisah (*detached leaf*) telah dijalankan untuk mengenal pasti aksesori keladi yang rintang terhadap *P. colocasiae*. Keadaan pengkulturan optimum untuk saringan secara in vitro telah disediakan di mana kultur kulat ditumbuhkan di atas medium *potato dextrose agar* (PDA) selama dua minggu pada suhu 25 °C. Daun keladi yang sihat daripada koleksi bank gen telah diinokulasi dengan spora *P. colocasiae* pada kepekatan 10⁴ cfu dan 10⁶ cfu, kemudian diletakkan di dalam gelap selama empat hari pada suhu 25 °C. Selepas empat hari inokulasi, simptom hawar pada daun telah direkod berdasarkan kadar indeks penyakit yang telah ditentukan. Berdasarkan sistem saringan in vitro ini, 12 aksesori keladi yang berbeza telah dinilai. Peratusan indeks penyakit (PDI) menunjukkan perbezaan yang signifikan di kalangan aksesori keladi. Saringan in vitro menggunakan esei kepingan daun terpisah ini merupakan kaedah yang efisien dalam membezakan aksesori keladi berdasarkan kerintangan terhadap *P. colocasiae*. Walaupun kaedah yang dinyatakan adalah standard untuk penyakit hawar daun keladi, namun kaedah ini mungkin dapat diperluas dengan mudah ke atas sistem penyakit lain yang melibatkan *Phytophthora* spp.

Summary

Taro (*Colocasia esculenta*) is an economically important ornamental flowering monocot that is highly susceptible to leaf blight diseases caused by the fungus *Phytophthora colocasiae*. An efficient in vitro screening system using a detached leaf disk assay to identify taro accessions with resistance to *P. colocasiae* was carried out. Optimal culturing conditions for the *P. colocasiae* in vitro screening assay were established in which fungal isolates were grown on potato dextrose agar medium for two weeks at 25 °C. Healthy taro leaf tissue from the gene bank collection was inoculated with 10⁴ cfu and 10⁶ cfu spores of *P. colocasiae* and incubated in the dark for four days at 25 °C. Four days after inoculation, until blight symptoms on leaves with a significant disease index (DI) rate were observed. Using the standardized in vitro screening system, nine different taro accessions were evaluated. The PDI significantly varied among the different accessions. In vitro screening by using the detach leaf assay is an efficient method in discriminating taro accession according to their resistance to *P. colocasiae*. Although the method described is a standard for taro leaf blight disease, this method could be easily extended to other disease system involving *Phytophthora* spp.

Pengarang

Nor Asiah Ismail (Dr.)

Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM

43400 Serdang, Selangor

E-mel: asiah@mardi.gov.my

Nurul Ammar Illani Jaafar, Zulhairil Ariffin, Maya Izar Khaidizar,

Nuradni Hashim dan Hamizan Abdul Jalil

Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM

43400 Serdang, Selangor

Umikalsum Mohamed Bahari

Pusat Penyelidikan Tanaman Industri

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM

43400 Serdang, Selangor

