

Mikroorganisma Antagonis Sebagai Kawalan Biologi Penyakit Utama Padi

Allicia Jack*, Kogeethavani Ramachandran

Pusat Penyelidikan Padi dan Tanaman Industri, MARDI Seberang Perai, Pulau Pinang, Malaysia

*Corresponding author: allicia@mardi.gov.my

Article history

Received :28 July 2014

Received in revised form :

11 September 2014

Accepted :16 September 2014

Graphical abstract



Abstract

In present study, 26 microbes consisted of 11 fungal isolates and 16 bacterial isolates were screened against blast disease pathogen (*Pyricularia oryzae*). All isolates were screened *in vitro* via dual culture bioassay. All fungal isolates collected were isolated from aerobic rice soils and the endophytic bacteria were isolated from the stem of healthy rice plants. Five isolates have been identified to be potential biocontrol agents as they recorded high PIRG (percentage inhibition of radial growth) values of more than 80%. Two isolates were identified as *Trichoderma* (F15 and F16) while the rest of them were bacteria isolates (I5, I6 and I16). 16S rDNA sequence analysis results showed that all three bacterial isolates were 100% similar to *Paenibacillus polymyxa* (Gene Bank accession number: GU332610.1).

Keywords: *Pyricularia oryzae*; endophytic bacteria; biocontrol agents; *Trichoderma*; *Paenibacillus polymyxa*

Abstrak

Dalam kajian ini, sebanyak 26 mikroorganisma yang terdiri daripada 11 isolat kulat dan 16 isolat bakteria telah disaring ke atas patogen penyakit karah (*Pyricularia oryzae*). Kesemua mikrob tersebut disaring secara *in vitro* menggunakan kaedah dual kultura. Kesemua kulat yang digunakan dalam ujikaji ini dipencil dari tanah tanaman padi aerob manakala bakteria endofit pula dipencil dari tisu batang pokok padi sihat. Lima isolat telah dikenal pasti mempunyai potensi sebagai agen kawalan biologi kerana menunjukkan keputusan PIRG (peratusan perencatan pertumbuhan radius) yang tinggi iaitu melebihi 80%. Dua isolat kulat dikenal pasti sebagai *Trichoderma* (F15 dan F16) manakala yang selebihnya terdiri daripada tiga isolat bakteria (I5, I6 dan I16). Keputusan analisis jujukan 16S rDNA menunjukkan ketiga-tiga bakteria endofit tersebut adalah 100% sama dengan *Paenibacillus polymyxa* (Nombor aksesi Bank Gen: GU332610.1).

Kata kunci: *Pyricularia oryzae*; bakteria endofit; agen kawalan biologi; *Trichoderma*; *Paenibacillus polymyxa*

© 2014 Penerbit UTM Press. All rights reserved.

1.0 PENGENALAN

Serangan penyakit merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi pengeluaran hasil padi. Pengurusan penyakit padi di Malaysia banyak bergantung kepada penanaman varieti padi rintang dan kawalan kimia seperti penyemburan racun. Penggunaan racun kimia dalam jangka masa yang panjang memberi kesan sampingan bukan sahaja kepada alam sekitar malah kesihatan manusia. Penggunaan racun secara berleluasa dan tidak sistematik juga mengganggu keseimbangan ekologi jelang padi. Selain itu, harga racun yang agak mahal di pasaran juga membebaskan petani dan meningkatkan kos pengeluaran padi. Penanaman varieti rintang secara meluas dalam jangkamasa yang terlalu lama dan faktor perubahan ciri-ciri virulen serta kepelbagaian patogen juga telah menurunkan daya rintangan pokok padi terhadap penyakit. Oleh yang

demikian, penggunaan agen kawalan penyakit biologi (biological control agent) semakin diberi perhatian dalam pengurusan penyakit tanaman bukan sahaja untuk padi malah tanaman komersil lain. Pengurusan penyakit menggunakan agen kawalan biologi yang berasaskan mikroorganisma antagonis merupakan salah satu komponen pengurusan perosak bersepadu atau IPM (Intergrated pest management). Ia sejajar dengan matlamat dan konsepnya iaitu ke arah pengurusan penanaman lestari serta mesra alam. Namun begitu tidak banyak kajian yang melaporkan mengenai intergrasi penggunaan mikroorganisma antagonis dengan kaedah pengurusan IPM yang lain. Kebanyakan eksperimen yang dijalankan lebih fokus kepada penggunaan agen kawalan biologi sebagai alternatif kepada racun kimia.

Agen kawalan biologi terdiri daripada pelbagai kumpulan mikroorganisma seperti bakteria, kulat dan virus yang terdapat pada alam semulajadi seperti di dalam tanah, air dan tumbuhan perumah. Hasil-hasil kajian menunjukkan bahawa bakteria bersifat antagonis amat efektif dalam mengawal pelbagai jenis kulat dan bakteria patogen. Selain itu ia juga dikatakan dapat meningkatkan kadar pertumbuhan tanaman. Sebagai langkah untuk mengurangkan penggunaan racun dan input baja kimia, bakteria dari rizosfera tanah telah digunakan di Brazil untuk mengawal penyakit karah daun dan penggalak pertumbuhan padi aerob (Filippi *et al.*, 2011). Pemilihan agen kawalan biologi bergantung kepada beberapa faktor penting iaitu, selamat digunakan oleh golongan sasaran, tidak bersifat patogenik kepada tanaman dan haiwan, mempunyai tahap kemandirian yang tinggi samada di dalam sel tisu perumah mahupun alam sekitar (dalam tanah), kadar reproduktif yang tinggi, ciri pengkolonian yang cepat, pesaing yang kuat, spektrum kawalan penyakit yang luas, meningkatkan hasil tanaman, kos formulasi murah dan senang untuk dihasilkan, boleh disimpan untuk jangkamasa panjang serta sesuai digunakan bersama bahan input pertanian yang lain seperti baja dan racun perosak.

2.0 BAHAN DAN KAEDAH

2.1 Pemencilan Kulat dari Sampel Tanah dengan Menggunakan Media RBA (Rose Bengal Agar)

RBA berfungsi untuk pemencilan mikrob secara selektif khususnya kulat sahaja kerana ianya merencat pertumbuhan bakteria. Proses pemencilan kulat dari tanah dilakukan dengan mencampurkan 10 g tanah bersama 100 ml air suling steril untuk dijadikan stok. Pencairan bersiri (serial ten-fold dilutions) dilakukan sehingga kepekatan 10¹⁰ ml. 1 ml stok yang sudah dicairkan kemudiannya dipipetkan ke dalam piring Petri kosong dan seterusnya RBA (Rose Bengal Agar) steril dituangkan ke dalam piring Petri tadi dan diinkubasi sehingga koloni kulat tumbuh.

2.2 Pemencilan dan Pengkulturan Bakteria Endofit dari Pokok Padi

Bakteria endofit telah dipencil dari sampel pokok padi yang sihat terutamanya pada bahagian batang. Pencairan bersiri sampel dilakukan sebelum dikulturkan melalui sebaran piring di atas NA (agar nutrien). Proses sub-kultur koloni bakteria yang tumbuh di atas piring agar dilakukan sehingga terhasilnya kultur tulen.

2.3 Saringan Antagonistik *In Vitro*

Kulat antagonis dan kulat patogen (*Pyricularia oryzae*) telah diinokulasi secara bertentangan di dalam piring Petri dalam saringan antagonistik *in vitro* (Gambar 1: A-B). Manakala untuk bakteria endofit, miselia patogen (diameter: 5 mm) diinokulasi di tengah-tengah piring Petri. Bacteria endofit diinokulasi pada jarak 2 cm dari pinggir piring Petri (Gambar 1: C-E). Ujikaji ini dijalankan dalam 4 replikasi. Pertumbuhan kulat patogen di dalam piring Petri direkod setiap hari. Bacaan PIRG (*percentage inhibition of radial growth*) yang diperolehi menentukan kekuatan antagonistik mikroorganisma yang disaring. Isolat yang mencatatkan bacaan PIRG melebihi 80% akan dipilih untuk kajian selanjutnya. Formula untuk pengiraan bacaan PIRG adalah seperti berikut: $(R1-R2)/R1 \times 100$; di mana R1 bacaan pertumbuhan radius kulat patogen pada piring kawalan (control) manakala R2 adalah bacaan pertumbuhan radius kulat

patogen pada piring rawatan (with tested isolate/antagonist).

2.4 Pencegaman Bakteria Endofit

Sampel bakteria telah dikultur pada media nutrien (nutrient broth) dan diinkubasi selama 24 jam. DNA genom daripada sampel bakteria diekstrak dengan menggunakan *taco™ Nucleic Acid Automatic Extraction System* (GeneReach Biotech, Taichung, Taiwan) mengikut protokol pengeluar. Amplifikasi PCR (tindakbalas berantai polimerase) 16S rDNA telah dijalankan dengan menggunakan pencetus fD1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGTATCTGGCTCAG-3') dan Rp2 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGTATCTGGCTCAG-3') (Weisburg *et al.*, 1991). Tindakbalas PCR dihasilkan dalam campuran 50 µL komponen PCR. Setiap tindakbalas PCR mengandungi 0.6 µL templat DNA, 1 µL 10 mM dNTP, 6 µL 25 mM MgCl₂, 10 µL 10x penampan *Taq* polimerase, 6 µL pencetus (5 pmols setiap satu) dan 0.25 µL (0.5 unit) *Taq* polimerase DNA (Promega, Wisconsin, USA). Amplifikasi PCR bermula dengan fasa penyahaslian awal pada 94°C selama 4 min diikuti dengan 35 kitaran penyahaslian pada 94°C selama 1 min, penyepuhan pada 58°C selama 1 min dan lanjutan pada 72°C selama 3 min. Kitaran lanjutan akhir adalah pada 72°C selama 10 min diikuti dengan penderaman pada 4°C. Produk PCR yang telah dituliskan dihantar ke *Mytag Biosains Ent.* untuk diujuk. Ujukan yang diperolehi dibandingkan dengan ujukan lain yang terdapat pada pangkalan data Bank Gen di *National Center for Biotechnological Information* (NCBI) dengan menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

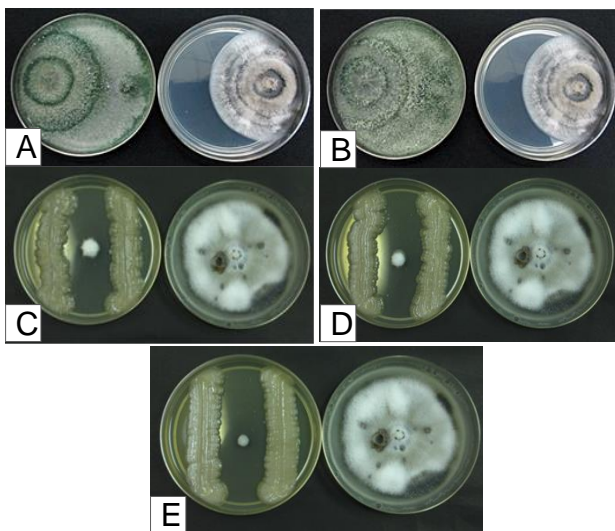
3.0 KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

Keputusan saringan menunjukkan lima daripada 26 mikrob yang diuji menunjukkan ciri-ciri antagonistik terhadap *P. oryzae*. Pencilan yang mempunyai potensi sebagai agen kawalan biologi tersebut terdiri dari dua isolat kulat dan tiga isolat bakteria endofit. F15 dan F16 mencatatkan nilai PIRG yang tinggi iaitu 99.20% dan 98.90% (Jadual 1) dan Gambar 1: A dan B. Kedua-dua isolat ini adalah dari kumpulan *Trichoderma*. Kulat *Trichoderma* banyak digunakan untuk mengawal penyakit bawaan tanah (soilborne disease) dan sebagai penggalak pertumbuhan bagi buah-buahan, sayuran, gandum dan padi. *Trichoderma harzianum* dilaporkan sangat berkesan dalam pengurusan penyakit reput pangkal batang kelapa sawit (Laila *et al.*, 2012). Mekanisma yang terlibat dalam interaksi antara *Trichoderma* dan *P. oryzae* adalah persaingan dan mikoparasitisme (mycoparasitism). *Trichoderma* mempunyai kadar pertumbuhan yang lebih cepat berbanding kulat patogen membolehkan ianya menguraikan dan menggunakan nutrien yang terdapat dalam agar dengan lebih cepat berbanding patogen yang diuji. Dalam mekanisme mikoparasitisme, *Trichoderma* juga menghasilkan antibiotik dan enzim pengurai dinding sel seperti 'chitinase' dan 'glucanase' yang menguraikan polisakarida, komponen utama dinding sel kulat seterusnya melemahkan kekuatan sel dinding patogen.

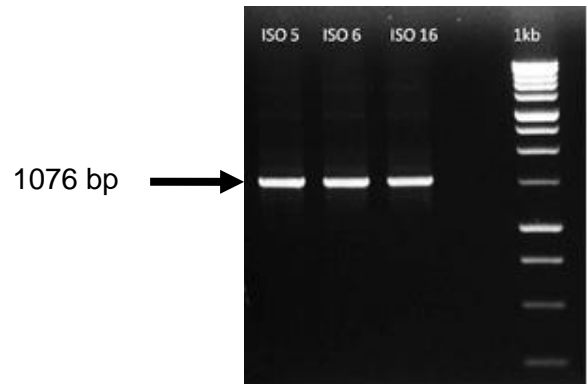
Jadual 1 Bacaan PIRG mikroorganisma antagonis yang mempunyai potensi sebagai agen kawalan biologi

Isolat	PIRG (%)
F15	99.20
F16	98.90
I5	84.48
I6	87.50
I16	92.50

Hasil keputusan pengecaman molekular 16S rDNA menunjukkan ketiga-tiga bakteria endofit I5, I6 dan I16 dikenalpasti sebagai *Paenibacillus polymyxa* (Gambar 2). *P. polymyxa* merupakan sejenis bakteria pengikat nitrogen gram-positif yang menghasilkan endospora dan turut berupaya merencat pertumbuhan patogen penyakit tumbuhan. Selain itu bakteria ini juga dilaporkan membantu pertumbuhan pokok. *P. polymyxa* lazimnya dipencil dari rizosfera tanah untuk tanaman seperti gandum, barli, kacang hijau dan bawang putih (Raza *et al.*, 2008). Dalam kajian ini ianya telah dipencil daripada batang pokok padi yang sihat. I5, I6 dan I16 juga mencatatkan bacaan PIRG yang tinggi iaitu melebihi 80%. *P. polymyxa* menunjukkan mekanisma antibiosis dengan menghasilkan metabolit antikulat yang merencat perkembangan miselia kulat patogen (Gambar 1: C-E). Keputusan proses saringan lanjut menunjukkan kelima-lima mikroorganisma antagonis ini turut mempunyai potensi dalam mengawal *Rhizoctonia solani* (patogen penyakit hawar seludang) secara *in vitro*.

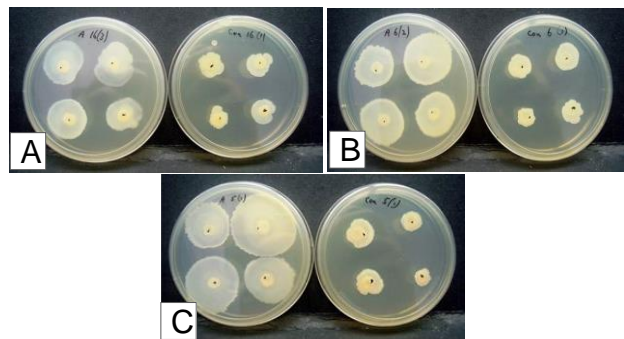


Gambar 1 Piring Petri di sebelah kanan dalam Gambar A-E merupakan kawalan (control). (A) F15 vs *P. oryzae*; (B) F16 vs *P. oryzae*. *Trichoderma* menunjukkan mekanisma persaingan. (C) I5 vs *P. oryzae*; (D) I6 vs *P.* dan (E) I16 vs *P. oryzae*. Ketiga-tiga bakteria endofit menunjukkan mekanisma antibiosis



Gambar 2 Keputusan dari gel elektroforesis; ISO 5, 6 dan 16 merupakan *Paenibacillus polymyxa*. 1kb DNA Ladder sebagai penunjuk

Jacobsen *et al.* (2004) menyatakan bahawa bakteria antagonis boleh mengawal penyakit dengan lebih efektif sekiranya digunakan secara kombinasi dengan racun kulat berbanding dengan aplikasi bakteria atau racun kulat sahaja. Namun begitu keadaan ini tidak dapat diperjelaskan. Dalam ujikaji untuk formulasi, bakteria I5, I6 dan I16 didapati tumbuh lebih cepat di dalam agar kentang (potato sucrose agar/PSA) yang diintegrasikan dengan racun kulat (separuh dari kadar biasa) berbanding dengan bakteria yang dikultur atas PSA biasa (tanpa campuran racun) (Gambar 3: A-C). Sekiranya dapat dibuktikan bahawa kombinasi formulasi ini mempunyai keberkesanan sama baik seperti penggunaan racun kulat sahaja, maka pengaplikasian racun berpotensi dikurangkan sehingga 50% dari kadar biasa yang disyorkan.



Gambar 3 Piring Petri yang di sebelah kiri dalam setiap gambar ialah bakteria yang dikultur dalam media yang ditambah racun kulat. Manakala piring Petri di sebelah kanan adalah kawalan (tanpa racun). (A) I16; (B) I6; (C) I5

4.0 KESIMPULAN

Kajian penggunaan agen kawalan biologi disarankan bukan sekadar membandingkan keberkesanan antara mikroorganisma antagonis dan racun kimia dalam mengawal penyakit tetapi juga potensi pengintegrasian kedua-dua elemen supaya sistem IPM yang digunakan untuk pengurusan penyakit dan perosak adalah lebih berkesan. Kajian lanjut mengenai kesesuaian formulasi yang boleh diguna pakai untuk mikroorganisma ini akan dijalankan dengan mengambil kira faktor-faktor persekitaran bagi memastikan keberkesanannya apabila diaplikasi di lapangan.

Penghargaan

Ribuan terima kasih diucapkan kepada staf patologi MARDI Seberang Perai, En. Han Teng Siew, Cik Nur Izwani Ahmad Puad dan Puan Suriaty Shamsudin yang telah membantu menjalankan penyelidikan di Makmal Patologi dan di ladang.

Rujukan

- [1] Filippi, M. C. C., Silva, G. B., Silva-Lobo, V. L., Cortes, M. V. C. B., Moraes, G. A. J. and Prabhu, A. S. 2011. Leaf Blast (*Magnaporthe oryzae*) Suppression and Growth Promotion by Rhizobacteria on Aerobic Rice in Brazil. *Biological Control*. 58: 160–166.
- [2] Jacobsen, B. J., Zidack, N. K. and Larson, B. J. 2004. The Role of Bacillus-based Biological Control Agents in Intergrated Pest Management Systems: Plant Diseases. *Phytopathology*. 11(94): 1272–1275.
- [3] Laila, N., Tan, S. G., Umi Kalsom, Y., Ho, C. L. and Abdullah, F. 2012. Biocontrol Agent *Trichoderma Harzianum* Strain FA 1132 as an Enhancer of Oil Palm Growth. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 35(1): 173–182.
- [4] Raza, W., Yang, W. and Shen, Q. R. 2008. Paenibacillus Polymyxa: Antibiotics, Hydrolytic Enzymes and Hazard Assessment. *Journal of Plant Pathology*. 90(3): 419–430.
- [5] Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification For Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*. 173(2): 697–703.