

IDENTIFIKASI JAMUR ENDOFIT PADA TANAMAN HUTAN MENGGUNAKAN PENANDA MOLEKULER: potensi bagi pengendalian penyakit dalam mendukung kegiatan biosekuriti tanaman hutan

Istiana Prihatini



PENDAHULUAN

- Biosekuriti tanaman hutan:
upaya memberikan perlindungan terhadap tanaman hutan mulai dari sebelum tanaman terserang hingga setelah terserang hama dan penyakit
- Jamur endofit:
hidup di dalam jaringan tubuh makhluk hidup tanpa menimbulkan gejala penyakit
- Jamur patogen:
beberapa jenis diduga memiliki fase endofitik sebelum menjadi patogen

Penelitian mengenai jamur endofit

- Keragaman jenis dan distribusi jamur endofit
- Peranan jamur endofit pada inang
- Pengaruh lingkungan dan genetik inang terhadap keragaman jenis jamur
- Pengaruh jamur endofit pada pertumbuhan jenis patogen tertentu
- Sintesis metabolit sekunder



Metode identifikasi jamur endofit

A. Isolasi jamur / Culture dependent



- Tidak semua jamur mampu hidup dalam media buatan
- Jamur yang tumbuh cepat meskipun tidak dominan akan lebih sering / lebih mudah terdeteksi
- keterbatasan karakter morfologi untuk identifikasi



Perlu alat tambahan untuk identifikasi jamur

B. Culture independent / direct PCR/ environmental PCR



- Mendeteksi lebih banyak jenis endofit, termasuk yang tidak terdeteksi oleh metode *culturing*
- Tersedia banyak penanda /karakter DNA untuk identifikasi

Analisis molekuler untuk identifikasi jamur

- Sekuensing gen misalnya rDNA (ITS, 18s, 28s, SSU); mt-LSU, nLSU, tef, B- tubulin
- Real time PCR
- Whole genome sequencing

Penggunaan metode *direct PCR* untuk survey jamur endofit

Tujuan:

- Mempelajari keragaman jenis jamur endofit yang ada pada daun *Pinus radiata*
- Mempelajari hubungan jamur endofit dengan penyakit Spring Needle Cast (SNC)
- Mempelajari hubungan jamur endofit dengan faktor genetik *P. Radiata* (tree family) dan umur daun



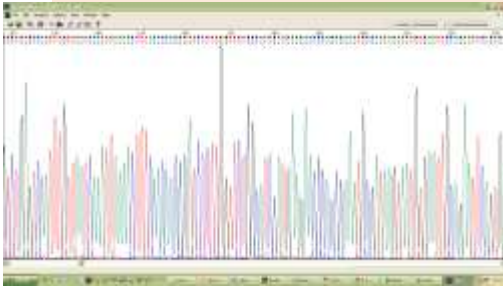
Tahapan penelitian:

1. Ekstraksi daun pinus
2. PCR dan elektroforesis
3. Kloning DNA hasil PCR
4. Sekuensing



Resistant and tolerant trees in a trial site in Oonah, Tasmania

5. Analisis hasil sekuensing

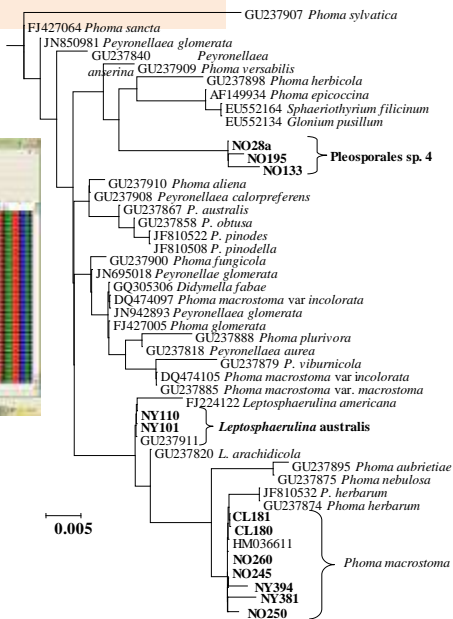


Kromatogram hasil sekuensing



6. Analisis filogenetik (Maximum Likelihood, Maximum Parsimony atau Bayesian)

- Untuk menentukan identitas jenis (*species delimitation*)



6. Analisis statistik

- Permutational multivariate ANOVA based on distances (PERMANOVA) untuk melihat hubungan jenis jamur dengan beberapa faktor yang berbeda
- canonical analyses of principal coordinates (CAP) untuk melihat distribusi jenis jamur pada kondisi yang berbeda



Hasil dan pembahasan

Identifikasi jenis jamur

- Terdapat 66 jenis Ascomycetes yang terdeteksi pada daun *P. radiata* umur 9 tahun di Oonah, Tasmania melalui metode *direct PCR*
- Jenis yang paling terdeteksi adalah Teratosphaeriaceae sp. 23 (Dothideomycetes)

Lokasi	Jumlah species / OTUs	Author	Jenis dominant
Selandia Baru	37	Ganley, 2006	<i>Lophodermium conigenum</i> (Leotiomyces)
Tasmania	45	Prihatini, <i>et al.</i> , unpublished	<i>L. pinastri</i> (Leotiomyces)

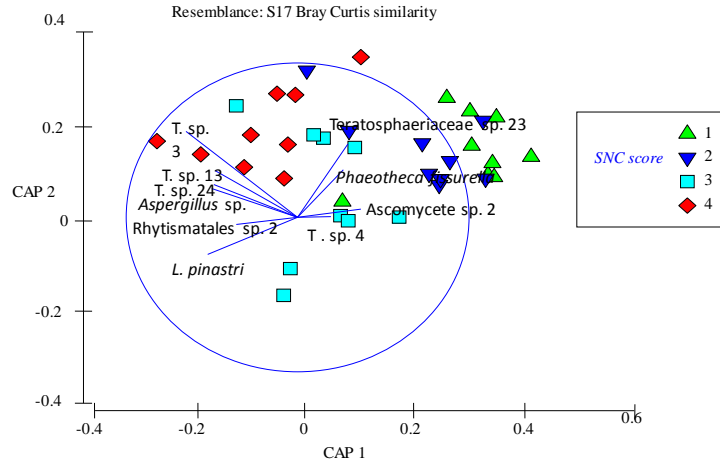
Tabel 1. Prevalensi jamur yang ditemukan pada daun dari tanaman *P. radiata* umur 9 tahun

Division / Class	No of Order	No of Family	No of OTU	Prevalence (%)
Dothideomycetes	5	15	45	69.19
Leotiomycetes	2	4	9	19.57
unknown Ascomycetes	?	?	6	6.98
Eurotiomycetes	2	3	5	4.07
Saccharomycetes	1	1	1	0.19

Asosiasi jenis jamur terhadap beberapa faktor

Tabel 2. Hasil analisis PERMANOVA pada tanaman *Pinus* umur 9 tahun

Source	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Unique perms
disease score (di)	3	13059	4352,9	1,670	0,0115	9875
tree family (fa)	2	5977,7	2988,8	1,147	0,2998	9926
needle age (ne)	2	4715,5	2357,8	0,905	0,6112	9893
di x fa	6	13574	2262,4	0,868	0,7622	9871
di x ne	6	19277	3212,8	1,233	0,1372	9862
fa x ne	4	8779,5	2194,9	0,842	0,7654	9873
Res	12	31278	2606,5			
Total	35	96660				



Gambar 1. Distribusi penyebaran jenis jamur pada daun *Pinus* hasil analisis CAP berdasarkan pada tingkat keparahan penyakit SNC, skor 1= sehat, 2= cenderung sehat, 3= sakit, 4= parah

Table 2. Prevalence of major fungal OTUs detected in a total of 36 pooled samples . Species in bold and high-lighted have been historically considered as the causal agents of SNC disease

OTUs	Disease severity ¹			
	1	2	3	4
Teratosphaeriaceae sp. 23	9	9	7	8
<i>C. minus 'simile'</i>	4	4	4	5
<i>Dothistroma septosporum</i>	4	6	2	4
<i>Phaeotheca aff. fissurella</i>	5	4	2	2
Teratosphaeriaceae sp. 3	0	2	3	7
<i>Lophodermium pinastri</i>	1	2	5	4
Ascomycete sp. 2	4	3	2	1
Ascomycete sp. 1	0	4	2	2
<i>Strasseria geniculata</i>	2	1	1	3
Teratosphaeriaceae sp. 4	3	2	2	0
Pleosporales sp 3	3	3	0	0
Teratosphaeriaceae sp. 13	0	1	1	4
<i>Aspergillus sp.</i>	0	0	2	4
Teratosphaeriaceae sp. 16	0	3	1	1
<i>C. minus 'verum'</i>	0	0	1	1

Kesimpulan

- Metode *direct PCR* mampu mendeteksi lebih dari 60 jenis jamur yang hidup pada daun *P. radiata*
- Sebagian besar jenis jamur tersebut tidak terdeteksi melalui metode isolasi (penumbuhan kultur jamur)
- Jenis jamur yang paling sering ditemukan pada daun *P. radiata* di Tasmania adalah dari kelompok Teratosphaeriaceae (Dothideomycetes) & Rhytismataceae (Leotiomycetes).
- Terdapat perbedaan yang signifikan antara komunitas jamur yang ditemukan pada tanaman yang tahan dan rentan terhadap penyakit SNC . Hal ini menarik untuk dikaji lebih jauh
- Metode *direct PCR* juga memiliki kekurangan lain selain biaya lebih mahal dan tahapan kerja lebih panjang, yaitu tidak terdeteksinya beberapa jenis jamur terutama dari golongan Sordariomycetes meskipun sangat mudah tumbuh pada media agar.

Implikasi bagi kegiatan di Balai Besar Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan

Metode penelitian yang serupa bisa diaplikasikan pada jenis tanaman yang berbeda untuk mempelajari karakter jamur endofit dan hubungannya dengan berbagai faktor yang mungkin berpengaruh pada ketahanan tanaman terhadap suatu jenis penyakit serta untuk mencari potensi biokontrol

Penanda DNA dapat digunakan untuk mendeteksi secara dini adanya jamur patogen pada jaringan tanaman sebelum tanaman menunjukkan gejala penyakit akibat infeksi jamur patogen

Penanda DNA dimanfaatkan untuk membedakan jenis-jenis patogen yang memiliki kemiripan karakter morfologi sehingga manajemen pengendalian penyakit dapat ditentukan dengan lebih tepat

