

Study on morphometric and genetic variations of *Phytophthora palmivora* for development of biological control of black pod rot disease on cacao using antagonistic bacteria

**Masanto
(16/405340/SPN/00600)**

Abstract

Black pod rot disease on cacao caused by *Phytophthora palmivora* is one of factors decreasing cocoa production in Indonesia. This research was conducted to study the morphometric, genetic and virulence variation of *P. palmivora* and to develop the control strategy using antagonistic bacteria. Morphologically, the collected isolates produced clumsy, coenocytic and hyaline hyphae, pappillate sporangium with various shapes and spherical chlamydospores. These features might be recognized as the characteristics of *P. palmivora* which were molecularly confirmed with PCR using species-specific primers. Sexually, A2-mating types were more dominantly found than A1-mating types with amphigynous antheridia and spherical oogonia and oospores. They were clustered into eight morphometric groups which were independent on host plant, mating types and geographical areas. Genetic diversity analysis using rep-PCR and microsatellite markers grouped the tested isolates into six clusters with different members. *P. palmivora* isolates were categorized into low, moderate and high virulent. They were positively amplified with eight virulence-related genes using PCR. Only four virulence-related genes were expressed under *in planta* test on model plant (*Nicotiana benthamiana*). Such expression of those genes was assumed as the general pathway in its virulence mechanisms. The growth of *P. palmivora* was inhibited by 127 of potential antagonistic bacterial isolates. The rep-PCR assay clustered them into 12 groups which were independent on cacao clones, orchards and geographical origins. SEM viewed morphological abnormality, hyphal lysis, shrinking and wrinkling. They were identified as members of *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Burkholderia* and *Sphingobium* genera. The optimum *in vivo* inhibition was exhibited by *B. subtilis*.

Keywords: black pod rot, cacao, genetic diversity, PCR, *Phytophthora palmivora*

Kajian variasi morfometrik dan genetika *Phytophthora palmivora* untuk pengembangan pengendalian hayati penyakit busuk buah hitam pada kakao menggunakan bakteri antagonistik

**Masanto
(16/405340/SPN/00600)**

Intisari

Penyakit busuk buah hitam pada kakao (*Theobroma cacao* L.) yang disebabkan oleh *Phytophthora palmivora* merupakan salah satu faktor yang menurunkan produksi kakao di Indonesia. Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji variasi morfometrik, genetika dan virulensi *P. palmivora* dan untuk mengembangkan strategi pengendalian menggunakan bakteri antagonistik. Secara morfologi, isolat-isolat yang dikoleksi memiliki hifa yang kaku, tidak bersekat dan hialin, sporangium berpapila dengan beragam bentuk dan klamidospora yang bulat. Fitur-fitur tersebut diketahui merupakan karakteristik *P. palmivora* yang kemudian secara molekuler dikonfirmasi dengan PCR multiplex menggunakan primer spesifik spesies. Secara seksual, tipe kawin A2 ditemukan lebih dominan daripada tipe A1 dengan antheridium yang *amphigynous* dan oogonium dan oospora yang bulat. Isolat-isolat ini diklasifikasi ke dalam delapan kelompok morfometrik yang tidak tergantung tanaman inang, tipe kawin dan daerah geografis. Analisis keragaman genetika menggunakan penanda rep-PCR dan mikrosatelit menunjukkan bahwa isolat-isolat yang diuji dikelompokkan ke dalam enam kluster dengan anggota kelompok yang berbeda. Isolat-isolat *P. palmivora* dikategorikan ke dalam kelompok virulensi rendah, sedang dan tinggi dengan reaksi positif terhadap delapan gen terkait virulensi menggunakan teknik PCR. Hanya empat gen terkait virulensi terekspresikan pada uji *in planta* di tanaman model (*Nicotiana benthamiana*). Ekspresi gen-gen semacam ini diasumsikan sebagai jalur umum dalam mekanisme virulensi *P. palmivora* yang menyebabkan penyakit busuk buah hitam pada kakao di Indonesia. Pertumbuhan *P. palmivora* dihambat oleh 127 isolat bakteri antagonistik yang potensial. Uji rep-PCR menunjukkan 12 kelompok isolat bakteri yang tidak tergantung pada klon kakao, kebun dan asal geografis. SEM menunjukkan abnormalitas morfologi pada hifa seperti lisis, menyusut dan berkerut. Isolat-isolat perwakilan diidentifikasi secara molekuler sebagai anggota genus *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Burkholderia* dan *Sphingobium*. Penghambatan *in vivo* yang optimum ditunjukkan oleh *B. subtilis*.

Kata kunci:* busuk buah hitam, kakao, keragaman genetika, PCR, *P. palmivora