แก่นเกษตร
KHON KAEN AGRICULTURE
JOURNAL KAJ

ผลของจุลธาตุของพืชต่อกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน ของ *Ganoderma boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าในปาล์มน้ำมัน

Effect of micronutrients on ligninolytic enzyme activities of *Ganoderma boninense*, a causal pathogen of basal stem rot disease in oil palm

ศรัณยา อินทรอนันต์[1] และ ธนัญชนก ไชยรินทร์[1]*

Sarunya Intara-anun[1] and Thanunchanok Chairin[1]*

[1] วิชาเอกการจัดการศัตรูพืช สาขาวิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

[1] Pest Management, Agricultural Innovation and Management Division, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University

* Corresponding author: thanunchanok.c@psu.ac.th

บทคัดย่อ: ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย แต่หนึ่งในปัญหาที่สำคัญในการผลิตปาล์มน้ำมันในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ คือโรคลำต้นเน่า (basal stem rot) ที่เกิดจากเชื้อรา *Ganoderma boninense* โดยเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายลิกนิน (ligninolytic enzyme) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งของผนังเซลล์พืช งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อ ทราบผลของจุลธาตุในรูปของ $FeSO_4$, $ZnSO_4$, MoO_3 และ $MnCl_2$ ความเข้มข้น 1 mM ที่มีต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยลิกนินที่ *G. boninense* K4/2 ผลิตขึ้นในสภาพห้องปฏิบัติการบนอาหารแบบแข็งที่มีรากของปาล์มน้ำมันเป็นวัสดุเลี้ยงเชื้อ และการทดสอบผลของจุลธาตุต่อเอนไซม์สกัดหยาบ ผลการศึกษาพบว่าจุลธาตุที่ศึกษาไม่ยับยั้งค่ากิจกรรมเอนไซม์ของลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) แต่ Zn และ Mn ทำให้เอนไซม์แลคเคส (lac) มีค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อ *G. boninense* บนอาหารแบบแข็ง นอกจากนี้พบว่าธาตุ Fe, Zn, Mo และ Mn ทำให้เอนไซม์สกัดหยาบมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ LiP, MnP และ lac ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

คำสำคัญ: *Ganoderma boninense*; โรคลำต้นเน่า; จุลธาตุ; เอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน

ABSTRACT: Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) is an important economic crop of Thailand. One of the key problems in oil palm production in Southeast Asia is basal stem rot disease caused by *Ganoderma boninense*. The fungus can produce ligninolytic enzymes to break down lignin, which is one of the main components of the plant cell wall. Therefore, this research aimed to find out the effect of micronutrients, i.e., $FeSO_4$, $ZnSO_4$, MoO_3 and $MnCl_2$ in concentration of 1 mM on the activity of the ligninolytic enzymes produced by *G. boninense* K4 / 2 on solid state media, contained oil palm roots as substrate, under laboratory condition. Moreover, the effect of micronutrients on the crude enzyme activities were also determined. The results showed lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) were not inhibited by supplemented micronutrients, but laccase (lac) activity was induced by Zn and Mn when cultured *G. boninense* on solid state media. In addition, Fe, Zn, Mo and Mn showed significantly decreased the LiP, MnP and lac activities in crude extracts when compared with untreated control.

Keywords: *Ganoderma boninense*; basal stem rot disease; micronutrients; ligninolytic enzyme

บทนำ

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางด้านการบริโภค และสามารถนำไปใช้ในทางด้านอุตสาหกรรมได้ (ศรีสุรางค์ และคณะ 2527) โดยจากข้อมูลในปี 2557 ประเทศไทยผลิตปาล์มน้ำมันได้ประมาณ 12.5 ล้านตัน เป็นอันดับ 3 ของโลกรองจากอินโดนีเซียและมาเลเซีย ซึ่งภาคใต้เป็นแหล่งเพาะปลูกปาล์มน้ำมันที่ใหญ่ที่สุดมีการผลิตถึง 11.42 ล้านตัน (ธีระพงศ์, 2559) แต่หนึ่งในปัญหาที่สำคัญในการผลิตปาล์มน้ำมันในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้คือโรคลำต้นเน่า (basal stem rot disease) ที่เกิดจากเชื้อรา *Ganoderma boninense* (Yu and Chong, 2018) เชื้อรา *G. boninense* สามารถสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายลิกนิน (ligninolytic enzyme) ที่เป็นส่วนประกอบหนึ่งของผนังเซลล์พืชได้ (Paterson, 2007) ซึ่งเอนไซม์ย่อยลิกนินได้แก่ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Lignin peroxidase; LiP) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidase; MnP) และแลคเคส (Laccase; lac) จากนั้นเชื้อราไปขัดขวางการขนส่งน้ำและสารอาหารไปยังส่วนบนของต้นปาล์มทำให้ใบของปาล์มน้ำมันเหลือง ใบยอดไม่คลี่ ใบล่างหักพับลง และเกิดดอกเห็ดบนลำต้นส่วนล่างของปาล์มน้ำมัน (Ho and Tan, 2015) ส่งผลให้ผลผลิตของปาล์มน้ำมันลดลง และปาล์มน้ำมันยืนต้นตายในที่สุด

อาการของโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันจะสังเกตเห็นได้ไม่ชัดเจนในระยะแรกจึงทำให้ยากต่อการควบคุม (Rahamah et al., 2012) แต่กลับพบว่าธาตุอาหารในดิน เช่น Fe, Zn และ Mn สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ของพืช (Tejirian and Xu, 2010) และปุ๋ยโพแทสเซียมสามารถลดความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อราได้ (Amtmann et al., 2008) จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นจึงหาวิธีป้องกันการเกิดโรคโดยทดสอบการใช้สารเคมีที่มีองค์ประกอบของ Fe, Zn, Mo และ Mn ซึ่งเป็นจุลธาตุที่พืชต้องการเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยลิกนินที่เชื้อ *G. boninense* ผลิตขึ้น ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ เพื่อทราบผลของ $FeSO_4$, $ZnSO_4$, MoO_3 และ $MnCl_2$ ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ *G. boninense* ผลิตขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง และผลของจุลธาตุต่อเอนไซม์สกัดหยาบ (crude enzyme) ในสภาพห้องปฏิบัติการ

วิธีการศึกษา

การเตรียมเชื้อรา *Ganoderma boninense* ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อราที่ใช้ในการทดลองได้แก่ *G. boninense* K4/2 จากห้องปฏิบัติการสาขาวิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการ (วิชาเอกการจัดการศัตรูพืช) คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยเลี้ยงรา *G. boninense* K4/2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 ℃ นาน 5 - 7 วัน จากนั้นนำเชื้อ *G. boninense* K4/2 ไปปลูกเชื้อบนรากของปาล์มน้ำมันในแต่ละกรรมวิธี

การเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง (Solid state cultivation)

เตรียมอาหารแบบแข็งโดยประยุกต์จากวิธีการของ Stajic et al. (2013) นำรากของปาล์มน้ำมันมาปั่นให้มีขนาด 1-2 ซม. เป็นวัสดุเลี้ยงเชื้อ (substrate) และใส่ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 125 มล. ปริมาณ 1 กรัม/ขวด โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (substrate + H_2O 5 มล.) กรรมวิธีที่ 2 (substrate + 1 mM $FeSO_4$·7 H_2O 5 มล.) กรรมวิธีที่ 3 (substrate + 1 mM $ZnSO_4$ 7 H_2O 5 มล.) กรรมวิธีที่ 4 (substrate + 1 mM MoO_3 5 มล.) และกรรมวิธีที่ 5 (substrate + 1 mM $MnCl_2$ ·4 H_2O 5 มล.) จากนั้นปิดฝาขวดด้วยฟอยล์อะลูมิเนียม แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) จากนั้นปลูกเชื้อ *G. boninense* K4/2 โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. เจาะชิ้นวุ้น (mycelial plug) แล้ววางบนอาหารทดสอบจำนวน 3 ชิ้น/ขวด นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 28 ± 2 °C เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นเมื่อครบเวลาจึงนำมาสกัดสารละลายเอนไซม์แบบหยาบด้วยการเติม 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.5) 10 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ แล้วนำไปเขย่าเป็นเวลา 1 วัน บนเครื่องเขย่าอัตโนมัติ ความเร็ว 120 รอบ/นาที นำของเหลวที่ได้จากการเขย่าไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ย่อยลิกนิน

การทดสอบผลของจุลธาตุต่อเอนไซม์สกัดหยาบ (Crude enzyme)

นำเอนไซม์สกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็งข้างต้นมาทดสอบโดยตรงกับ $FeSO_4$ ·7 H_2O, $ZnSO_4$ ·7 H_2O, MoO_3 และ $MnCl_2$ ·4 H_2O ที่มีความเข้มข้น 1mM เติมลงไปในสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบ ในอัตราส่วน 1 : 1 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 °C) เป็นเวลา 1 ชม. และนำไปตรวจสอบค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ย่อยลิกนิน

การตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์

การหาค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส โดยใช้ 4 mM substrate (2,6-dimethoxyphenol; DMP) ละลายในน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร เป็นสารตั้งต้น แล้วผสมกับ 50 mM acetate buffer (pH 5.0) 500 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 350 ไมโครลิตร และตัวอย่างเอนไซม์ 100 ไมโครลิตร ลงใน cuvette จากนั้นผสมสารให้เข้ากัน แล้วนำใส่เครื่องวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงรุ่น UV 5300 (METASH, China) ที่ความยาวคลื่น 470 nm จดบันทึกค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นเวลา 2 นาที (Chairin et al., 2014)

การหาค่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซเดส โดยใช้ 4 mM 2,6 - DMP ละลายในน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร เป็นสารตั้งต้น แล้วผสมกับ 50 mM acetate buffer (pH 5.0) 500 ไมโครลิตร 1mM $MnSO_4$ 350 ไมโครลิตร และตัวอย่างเอนไซม์ 100 ไมโครลิตร ลงใน cuvette จากนั้นผสมสารให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่เปลี่ยนแปลงไปที่ความยาวคลื่น 470 nm เป็นเวลา 2 นาที (Wariishi et al., 1992)

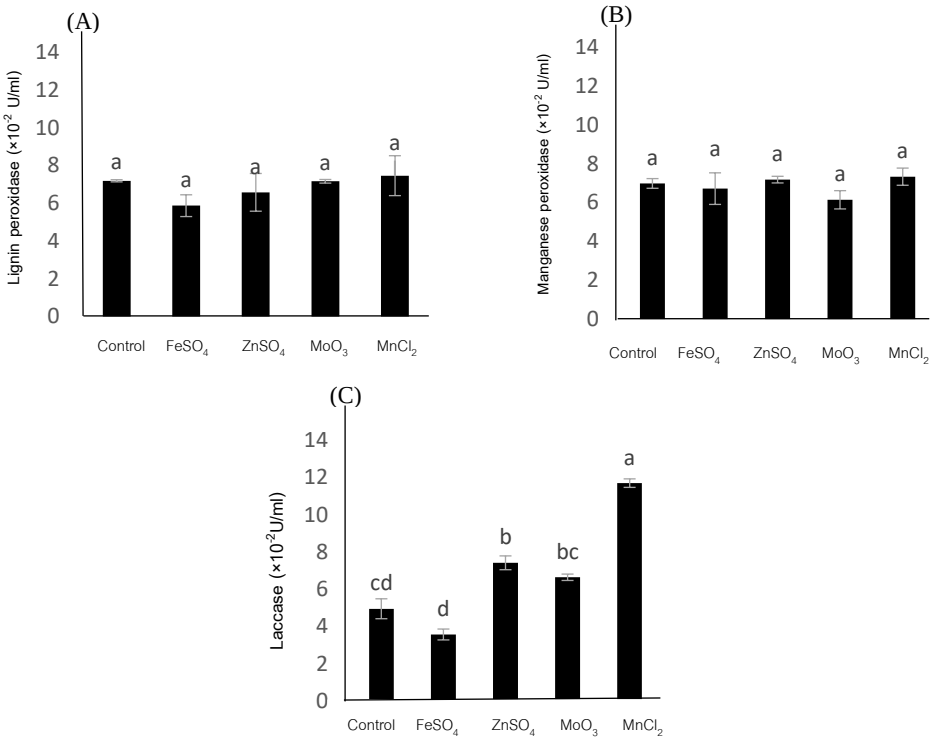
การหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส โดยใช้10 mM substrate (3-ethylbenthiazoline-6-sulphonic acid : ABTS) ละลายในบัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตร เป็นสารตั้งต้น แล้วผสมกับ 50 mM acetate buffer (pH 5.0) 750 ไมโครลิตร 0.3 % H_2O_2 100 ไมโครลิตร และตัวอย่างเอนไซม์ 50 ไมโครลิตร ลงใน cuvette จากนั้นผสมสารให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่เปลี่ยนแปลงไปที่ความยาวคลื่น 420 nm เป็นเวลา 2 นาที (Kuwahara et al., 1984)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมเอนไซม์ในแต่ละกรรมวิธีด้วยโปรแกรม statistical package for the social sciences (IBM SPSS version 23) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ตามวิธีการของ Tukey's Honesty Significant Difference (HSD)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการทดสอบเลี้ยงเชื้อบนอาหารแบบแข็งที่เติมจุลธาตุ พบว่าการเติมจุลธาตุทั้งหมดในการทดสอบครั้งนี้ไม่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ที่เชื้อ *G. boninense* K4/2 สร้างขึ้นในสภาพห้องปฏิบัติการ (**Fig. 1A, B**) แต่การเติม $ZnSO_4$ และ $MnCl_2$ ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสเพิ่มขึ้นเป็น 7.42 ± 0.37 และ 11.69 ± 0.23 $\times 10^{-2}$ ยูนิต/มล. ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคส 4.96 ± 0.53 $\times 10^{-2}$ ยูนิต/มล. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (**Fig. 1C**) ซึ่งแสดงผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Stajic et al. (2013) ที่เลี้ยงเชื้อ *Pleurotus ostresatus* บนอาหารแบบแข็งที่เติมจุลธาตุ 1 mM Fe, Zn, Na และ Se พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสเพิ่มขึ้นเมื่อเติม Zn แต่ในทางกลับกันจุลธาตุสามารถควบคุมกิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืช (Romheld and Marschner, 1991) จึงสามารถชะลอการเจริญของเส้นใยเชื้อรา และธาตุอาหารบางชนิดเช่น Mn ยังสามารถสร้างสารพิษที่ส่งผลต่อเชื้อรา (Tengoua et al., 2014) จึงส่งผลให้ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส นอกจากนี้การที่รากไม่ได้ดูดซับจุลธาตุเหล่านั้นเข้าไปก็อาจส่งผลต่อการเจริญของพืช แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของรา และความเข้มข้นของธาตุอาหารด้วยเช่นกัน (Couto et al., 2005)

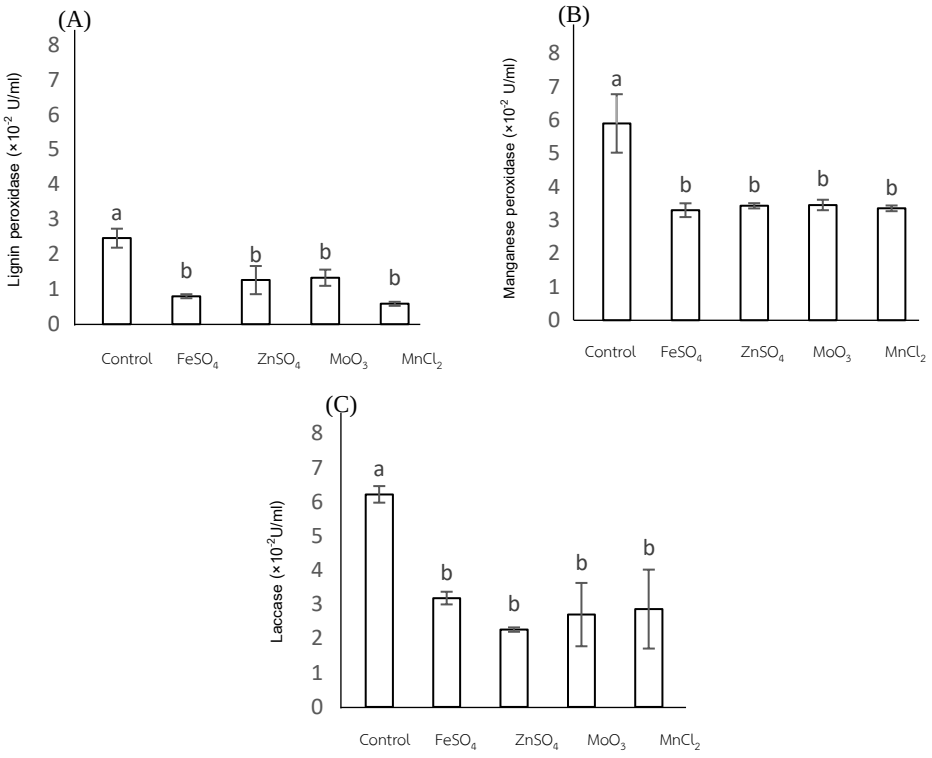


*The different letter on each bar means significant difference by Tukey's HSD ($P < 0.05$)

Figure 1 Efficiency of micronutrients on ligninolytic enzymes production by *G. boninense K4/2* under solid state cultivation; (A) lignin peroxidase, (B) manganese peroxidase and (C) laccase

จากการทดสอบผลของจุลธาตุต่อเอนไซม์สกัดหยาบ พบว่ากรรมวิธีทั้งหมดที่เติม $FeSO_4$, $ZnSO_4$, MoO_3 และ $MnCl_2$ ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคสมีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (**Fig. 2**) ซึ่งธาตุ Zn และ Mn สามารถขัดขวางตำแหน่ง active site ของเอนไซม์ของลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่เชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* สร้างขึ้น (Chang and Bumpus, 2001) และ Zn สามารถลดการเจริญและพัฒนาเส้นใยของเชื้อ *Ganoderma* sp. ทำให้เชื้อสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินได้น้อยลง (Graham and Webb, 1991) ส่วนธาตุ Fe สามารถขัดขวางตัวเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส (Manavalan et al., 2015)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า Fe, Zn และ Mn สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสที่เป็นส่วนประกอบหนึ่งของผนังเซลล์พืชได้อีกด้วย (Tejirian and Xu, 2010)



*The different letter on each bar means significant difference by Tukey's HSD ($P < 0.05$)

Figure 2 Efficiency of micronutrients on crude enzyme from *G. boninense* K4/2; (A) lignin peroxidase, (B) manganese peroxidase and (C) laccase

สรุป

การเลี้ยงเชื้อ *G. boninense* บนอาหารแบบแข็งที่มีรากของปาล์มน้ำมันเป็นวัสดุเลี้ยงเชื้อ และมีธาตุ Fe, Zn, Mo และ Mn ผสมอยู่ส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยลิกนินที่เชื้อรา *G. boninense* ผลิตขึ้น ได้แก่ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสลดลง แต่ไม่ส่งผลต่อเอนไซม์แลคเคส ส่วนการบ่มจุลธาตุร่วมกับเอนไซม์สกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารแบบแข็งโดยตรงส่งผลให้เอนไซม์ย่อยลิกนินทั้ง 3 ชนิด มีค่ากิจกรรมลดลง

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจาก สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 3 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

ธีระพงศ์ จันทรนิยม. 2559. คู่มือเกษตรกรการผลิตปาล์มน้ำมันอย่างมีประสิทธิภาพศูนย์วิจัย และพัฒนาการผลิตปาล์มน้ำม ัันคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช, ปราณี ลิ่มศรีวิไล และปรีชา สุรินทร์. 2527. โรคและอาการผิดปกติของปาล์มน้ำมันในไทยวารสารวิชาการ . เกษตร. 2: 221–228.

Amtmann, A., S. Troufflard, and P. Armengaud. 2008. The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plant. Physiologia Plantarum. 133: 91–682.

Chairin, T., T. Nitheranont, A. Watanabe, Y. Asada, C. Khanongnuch, and S. Lumyong. 2014. Purification and characterization of the extracellualar laccase produced by *Trametes polyzona* WR710–1 under solid state fermentation. Journal of Basic Microbiology. 54: 35–43.

Chang, H. C., and J. A. Bumpus. 2001. Inhibition of lignin peroxidase-mediated oxidation activity by ethylenediamine tetraacetic acid and N-N-N'-N'-tetramethylenediamine. Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life Sciences. 25: 26–33.

Couto, S. R., M. A. Sanroman, and G. M. Gubitz. 2005. Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsute*. Chemosphere. 58: 417–422.

Graham, R. D. 1983. Effects of nutrient stress on susceptibility of plants to disease with particular reference to the trace elements. Advances in Botanical Research. 10: 221–276.

Graham, R. D., and M. J. Webb. 1991. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. Soil Science Society of America. 329–370.

Ho, C. L., and Y. C. Tan. 2015. Molecular defense response of oil palm to *Ganoderma* Infection. Phytochemistry. 114: 168–177.

Kuwahara, M. J., K. Glenn, M. A. Morgan, and M. H. Gold. 1984. Separation and characterization of two extracellular H2O2- dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiology Letters. 169: 247–250.

Manavalan, T., V. Manavalan, K. P. Thangavelu, A. Kutzner, and K. Heese. 2015. Characterization of a solvent-tolerant manganese peroxidase (MnP) from *Ganoderma lucidum* and its application in fruit juice clarification. Journal of Biochemistry. 39: 754–764.

Paterson, R. R. M. 2007. *Ganoderma* Diseases of oil palm–A white root perspective necessary for integrated control. Crop Protection. 26: 1369–1376.

Romheld, V., and H. Marschner. 1991. Function of micronutrients in plants. 2nd Edition. Soil Science Society of America Book Series.

Stajic, M., J. Vukojevic, A. Knezevic, and I. Milovanovic. 2013. Influence of trace element on ligninolytic enzyme activity of *Pleurotus ostreatus* and *P. pulmonarius*. BioResources. 8: 3027–3037.

Tejirian, A., and F. Xu. 2010. Inhibition of cellulase-catalyzed lignocellulosic hydrolysis by iron and oxidative metal ions and complexes. Applied and Environmental Microbiology. 7673–7682.

Tengoua, B. F., M. M. Hanafi, A. S. Idris, K. Jugah, J. N. M. Azwa, M. Hasmah, and S. R. Syed-Omar. 2014. Effect of micronutrients-enriched fertilizers on basal stem rot disease incidence and severity on oil palm)*Elaeis guineensis* Jacq.) seedling. America Journal Applied Science. 11: 1841 – 1859.

Wariishi, H., K. Valli, and M. H. Gold. 1992. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, Kinetic mechanism and role of chelators. Journal of Biological Chemistry. 267: 23688–23695.

Yu, G. and K. P. Chong. 2018. Selected biomarkers from oil palm-*Ganoderma* infected tissues for detection of basal stem rot disease. WMSU Research Journal. 37: 1–13.