

Identifikasi Molekuler Begomovirus Penyebab Penyakit Keriting Kuning pada Tanaman Tomat di Jawa Tengah

Molecular Identification of Begomovirus causing Yellow Leaf Curl on Tomato Plants in Central Java

Sedyo Hartono

*Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian UGM,
Bulaksumur P.O. Box 1, Yogyakarta. Telp./Fax. 0274-523926
sedyohartono@yahoo.com*

ABSTRACT

Tomato plants showing Begomovirus-like symptoms, consisting of yellowing, leaf curling and distortion, were collected from fields located in the Magelang, Central Java. Total DNA was extracted from infected leaf tissue using Nucleon PHYTOpure plant DNA extraction kit. Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the coat protein region of the virus using universal degenerate primers designed by Krusty and Homer. The PCR amplified DNA product (approx. 504 bp) was cloned and sequenced. The nucleotide or amino acid sequences and BLAST search revealed highest homology with *Tomato yellow leaf curl virus* Kanchanaburi-1&2 isolated from Thailand.

Keyword: tomato, begomovirus, PCR

PENDAHULUAN

Tomat merupakan produk hortikultura yang sangat penting di Indonesia. Namun dalam budidayanya banyak kendala yang menghambat peningkatan produksi yang disebabkan oleh penyakit tumbuhan. Penyakit yang akhir-akhir dirasa sangat merugikan di sentra pertanaman tomat di Kabupaten Magelang, Jawa Tengah adalah penyakit virus gemini. Tanaman yang terinfeksi penyakit ini menunjukkan gejala berupa klorosis pada daun, tepi daun menggulung ke bawah atau ke atas seperti mangkuk (cupping), daun keriting dan menguning, tanaman menjadi kerdil dan bunga rontok (Gambar 1). Gejala ini mirip seperti infeksi *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) yang pernah dilaporkan di berbagai negara di Mediterania, Afrika, Asia, Australia, dan Amerika (Polston and Anderson 1997; Pico *et al.*, 1996). TYLCV merupakan salah satu penyakit tomat yang sangat merugikan di seluruh dunia (Salati *et al.*, 2002). TYLCV mempunyai genom DNA untai tunggal monopartit atau bipartit yang

terkapsidasi di dalam partikel kembar (geminata). TYLCV adalah anggota genus Begomovirus, yang termasuk dalam famili Geminiviridae (Navot *et al.*, 1991).

Survei penyakit di lapangan menunjukkan adanya kecenderungan peningkatan luas serangan dan intensitas TYLCV. Hal ini berhubungan dengan terjadinya peningkatan populasi *whitefly* (*Bemisia tabaci*) sebagai vektor yang menularkan virus secara persisten. Pada tahun 2003 tercatat intensitas serangan virus pada tanaman tomat baru mencapai 27%, tetapi pada awal tahun 2006 intensitas penyakit di Magelang mencapai hampir 100%. Survei penyakit yang dilakukan di Jawa Barat dan Lampung pada tahun 2001 juga melaporkan adanya intensitas penyakit virus ini pada tanaman tomat mencapai 50% (Sudiono *et al.*, 2001). Oleh karena itu, suatu prosedur dibutuhkan untuk mendeteksi geminivirus secara cepat dan spesifik, baik untuk mendeteksi virus di dalam tanaman maupun di dalam tubuh *B. tabaci* guna membantu kajian epidemiologi dan pengendalian penyakitnya (Nakhla and Maxwell, 1998).

Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) akhir-akhir ini banyak digunakan untuk mendeteksi geminivirus secara cepat dan akurat dari berbagai sampel tanaman sakit dan serangga vektor di berbagai negara (Rojas *et al.*, 1993; Navot *et al.*, 1992; Wyatt and Brown, 1996). Metode PCR juga telah berhasil digunakan untuk mendeteksi geminivirus asal tomat tomat maupun cabai dari sampel yang dikumpulkan dari berbagai daerah di Indonesia (Sudiono *et al.*, 2001; Sulandari *et al.*, 2001; Hidayat *et al.*, 1999). Namun demikian informasi mengenai data sekuen geminivirus pada tanaman tomat di Indonesia masih sangat terbatas.

Penelitian ini ditujukan untuk melakukan identifikasi Begomovirus pada tomat asal Magelang, Jawa Tengah dengan teknik PCR, dilanjutkan kloning dan sekuensing, serta menentukan klasifikasi virus sampai aras spesies.

METODE PENELITIAN

Isolat virus.- Bahan tanaman sakit yang digunakan untuk penelitian ini diambil dari tanaman tomat di Kabupaten Magelang, Jawa Tengah yang menunjukkan gejala pada daun menggulung seperti mangkuk, bergelombang atau keriting dan menguning. Sampel tanaman sakit kemudian disimpan pada suhu -20 °C dan dalam bentuk kering segar (*freeze dried*) untuk pengujian selanjutnya.

Isolasi DNA dan PCR.- Total DNA diekstraksi dari sample tanaman sakit dengan menggunakan Nucleon PHYTOpure plant DNA extraction kit (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) mengikuti petunjuk dari pabrikan. Bagian gen dari mantel protein virus (*coat protein*, CP) diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan sepasang primer universal Krusty dan Holmer yang didesain untuk mengamplifikasi target gen CP dari kelompok Begomovirus (Revill *et al.*, 2003). Taq polimerase digunakan di dalam 50 µL campuran reaksi PCR yang mengandung 1 µL DNA total, Bufer PCR untuk Taq polymerase, 0,2 mM dNTP, dan 25 pmol untuk masing-masing primer. Setelah dilakukan denaturasi awal pada suhu 94 °C selama 2 menit, PCR dilanjutkan dengan 35 siklus dengan urutan sebagai berikut: 94 °C selama 1 menit, 58 °C selama 1 menit, dan 72 °C selama 1 menit, serta

diikuti dengan tahap pemanjangan akhir pada suhu 72 °C selama 3 menit. Hasil PCR kemudian dianalisis dalam 5% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) di dalam bufer TBE dan divisualisasi dengan pengecatan ethidium bromida. Hasil PCR yang berupa pita DNA dan tampak pada UV-transluminator dipotret dengan kamera digital.

Kloning dan Sekuensing.- Pita DNA yang nampak pada PAGE dipotong dan dimurnikan (*electro-elusion*) menggunakan prosedur standar (Sambrook and Russell, 2001) dan diligasikan dalam vektor plasmid pUC19 yang telah dipotong dengan enzim restriksi SmaI. Hasil ligasi kemudian ditransformasikan ke dalam sel kompeten *Escherichia coli* strain DH5^α (Gibco BRL). Sel kemudian ditumbuhkan di atas medium Luria-Bertani (LB) yang mengandung ampisilin dan kromogenik substrat, X-gal. Koloni bakteri yang tumbuh berwarna putih diseleksi. Plasmid DNA diisolasi dengan menggunakan metode standar alkaline lysis mini-preparation (Sambrook and Russell, 2001). Plasmid yang mengandung DNA target (kurang lebih 504 bp) dipilih untuk disekuens. Paling sedikit tiga klon disekuens dalam dua arah menggunakan DSQ 1000L sekuenser (Shimadzu, Kyoto, Japan).

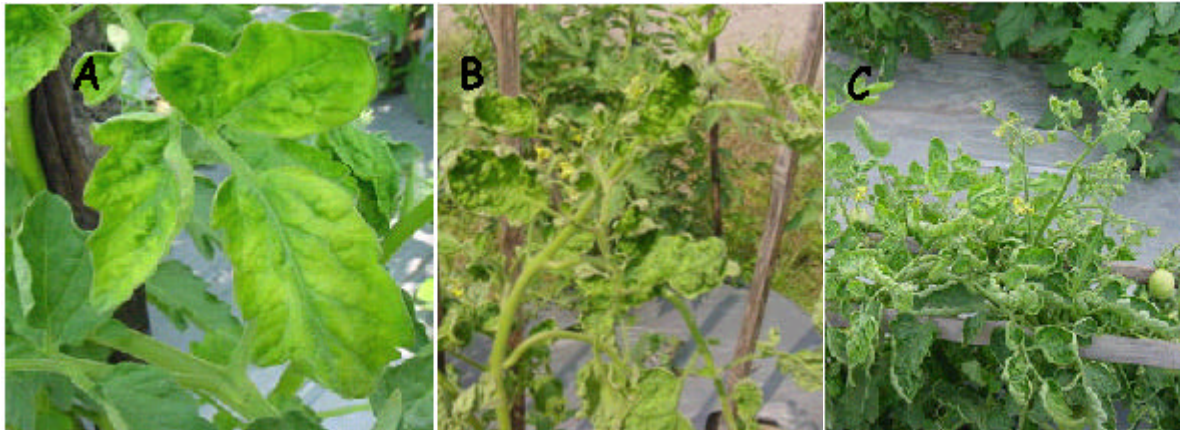
Analisis Sekuen Nucleotida.- Hasil sekuensing berupa nukleotida atau asam amino selanjutnya dibandingkan dengan data sekuen yang ada di GeneBank database. *Multiple sequence alignments* dan *phylogram* dilakukan dengan menggunakan program Protein and DNA alignment di dalam paket GeneWork (IntelliGenetics Inc.) atau menggunakan layanan program CLUSTAL W dari situs EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>) secara online.

HASIL DAN PEMBAHASAN

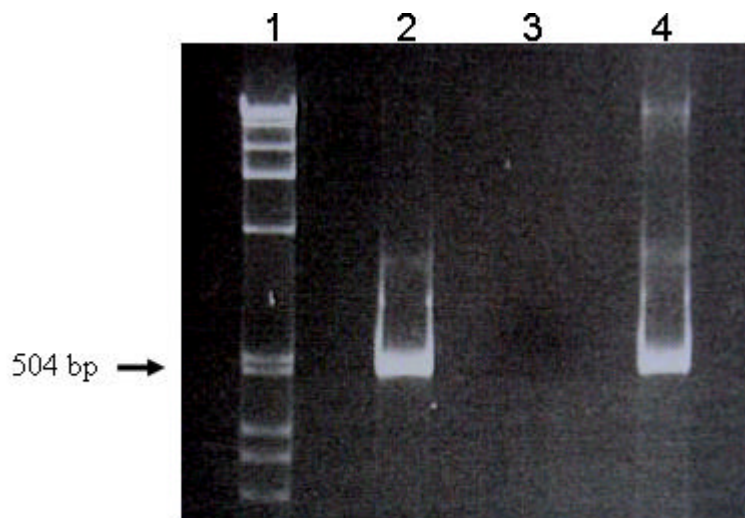
PCR yang dilakukan dengan menggunakan universal primer Krusty dan Homer menghasilkan pita DNA yang sangat jelas dengan berat molekul sekitar 504 bp untuk sample tanaman tomat dan cabai yang terinfeksi Begomovirus (Gambar 2). Ini membuktikan bahwa metode PCR sangat sesuai untuk mendeteksi geminivirus. Geminivirus mengandung asam nukleat berupa DNA untai

tunggal, sehingga DNAnyapun dapat secara langsung digunakan sebagai *template* dalam PCR (Rojas *et al.*, 1993). Pita DNA ini kemudian dipotong, dimurnikan, kemudian dikloning dan diseku.

Hasil data sekuen kemudian dianalisis dan dibandingkan dengan sekuen dari anggota *Begomovirus* lainnya yang telah ada di dalam Genbank database.



Gambar 1. Tanaman tomat terinfeksi di lapangan menunjukkan gejala berupa daun klorosis atau menguning (A); daun keriting tidak beraturan (B); tepi daun menggulung ke atas seperti mangkuk (*cupping*) dan tanaman kerdil (C).



Gambar 2. Hasil PCR menggunakan primer Krusty and Homer yang dielektroforesis dalam 5% gel polyacrilamide dengan pengecatan ethidium bromida. Lajur 1: 1 kb DNA ladder; lajur 2: sampel tanaman tomat sakit asal Magelang; lajur 3: sampel tanaman ketela pohon yang tidak terinfeksi *Begomovirus*; dan lajur 4: sampel tanaman cabai terinfeksi *Bogomovirus*.

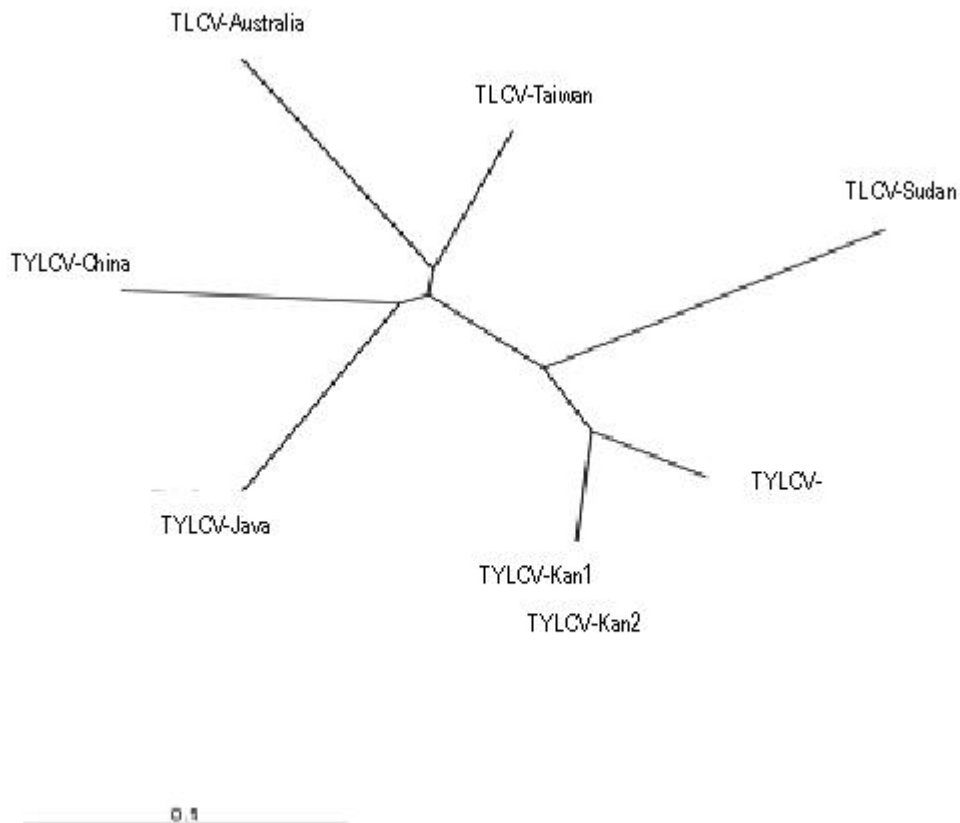
```

TYLCV-Kan1      GPCKVQ SFEQRHDITHGK VLCVSDVTRGNGITHRIGKRF CVKSVYVMGKIWMDENIKLK
TYLCV-Kan2      GPCEVQ SFEQRHDITHGK VLCVSDVTRGNGITHRIGKRF CVKSVYVMGKIWMDENIKLK
TYLCV-Mage 1 ang GPCKVQ SFEQRHDVTHGK VLCVSDVTRGGGITHRVGKRF CVKSVYIIGKVWMDENIKSK
                **.*.*****.*.*****.*****.*****.*.*****.*.*****.*.*****.*
                *

TYLCV-Kan1      NHTNTVMFWLVRDRR PVTPPYGFGELF NMYDNEPSTATIK NDLRDRVQ VLHRFSASL TGG
TYLCV-Kan2      NHTNTVMFWLVRDRR PVTPPYGFGELF NMYDNEPSTATIK NDLRDRVQ VLHRFSASL TGG
TYLCV-Mage 1 ang NHTNNVMFWLVRDRR PVTPPYGFGELF NMYDNEPSTATIK NDLRDRVQ VLHRFSATVTGG
                **.*.*****.*.*****.*****.*****.*****.*****.*.*****.*
                *

TYLCV-Kan1      QYASKEQAVIKKFFRVNNYWYNHQEA AKYENHTENALLLYMACHTA 167
TYLCV-Kan2      QYASKEQAVIKKFFRVNNYWYNHQEA AKYENHTENALLLYMACHTA 167
TYLCV-Mage 1 ang QYASKEQAVIKRFFRVNNYWYNHQEA AKYENHTENALLLYMACHTA 167
                *****.*.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*
                *
    
```

Gambar 3. Perbandingan sekuen asam amino dari TYLCV-Mag dengan TYLCV-Kan1 dan 2 isolat asal Thailand menggunakan Program CLUSTAL W (1.83). Tanda asterisk (*) di bawah sekuen menunjukkan asam amino yang identik antar ketiga sekuen.



Gambar 4. Filogram yang merepresentasikan hubungan kekerabatan antara TYLCV-Mag dengan isolat Begomovirus lain yang ada di GenBank database

Hasil searching internet menggunakan program BLAST menemukan adanya homologi DNA tertinggi (91%) dengan isolat *Tomato Yellow Leafcurl Virus*-Kanchanaburi 1 dan 2 (TYLCV-Kan 1 dan 2) asal Thailand. Dari 485 nukleotida yang dibandingkan, 442 nukleotida diantaranya identik atau 43 nukleotida saja yang berbeda. Sedangkan perbandingan sekuen asam amino

menggunakan program Clustal W antara Begomovirus asal Magelang dengan TYLCV-Kan 1 dan 2 juga memberikan hasil 91% asam amino yang identik (Gambar 3). Menurut pedoman dari International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), apabila persamaan sekuen asam amino dari gen CP antara satu virus dengan virus lain lebih dari 90%, dikatakan bahwa virus tersebut

merupakan spesies virus yang sama (Padidam *et al.*, 1995). Oleh karena itu, nama spesies Begomovirus asal Magelang adalah TYLCV-Mag. Hal ini juga didukung oleh hasil analisis filogram yang mengelompokkan TYLCV-Mag ke dalam satu klaster dengan TYLCV-Kan 1 dan 2, dan berbeda klaster dengan Begomovirus lain termasuk TYLCV-Java, yaitu TYLCV yang pernah dilaporkan sebelumnya di Jawa Barat (Gambar 4).

Perbedaan dengan TYLCV-Java ini dapat terjadi akibat adanya rekombinasi DNA antar anggota Begomovirus sehingga perbandingan sekuen asam amino dari CPnya hanya identik 80% saja. Terjadinya rekombinasi antar spesies pada beberapa geminivirus sudah sering dilaporkan, salah satu diantaranya terjadi pada tanaman tomat (Kirthi *et al.*, 2002), sehingga hasil rekombinan ini mengakibatkan munculnya penyakit Geminivirus baru.

KESIMPULAN

Metode PCR menggunakan primer universal Krusty&Homer sangat sesuai untuk deteksi Begomovirus yang menginfeksi tomat.

Hasil sekuen nukleotida dan asam amino gen coat protein dari Begomovirus asal Magelang menunjukkan persamaan dengan TYLCV-Kan 1 and 2 asal Thailand, sehingga dinamakan TYLCV-Mag.

Sekuen TYLCV-Mag berbeda dengan TYLCV-Java isolate Jawa Barat yang telah dilaporkan sebelumnya.

SANWACANA

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Prof. T. Natsuaki dan Prof. S. Okuda dari Utsunomiya University, Japan, yang telah memberikan fasilitas penelitian untuk kloning dan sekuensing Begomovirus asal Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

Hidayat, S.H., E.S. Rusli, dan N. Aidawati. 1999. Penggunaan primer universal dalam polymerase chain reaction untuk

mendeteksi virus gemini pada cabai. Prosiding Kongres Nasional XV dan Seminar Ilmiah PFI, Purwokerto, 16-18 September, 1999.

- Kirthi, N., S.P. Maiya, M.R.N. Murthy, and H.S. Savithri. 2002. Evidence for recombination among the Tomato Yellow Leaf Curl Virus strains/species from Bangalore, India. *Arch. Virol.* 147:255-272.
- Nakhla, M.K. and D.P. Maxwell. 1998. Epidemiology and Management of Tomato Yellow Leaf Curl Disease *In Plant Virus Disease Control*. Hadidi et al. (Eds.). APS Press. St. Paul, Minesota. 565-583.
- Navot, N., E. Picherski, M. Zeidan, D. Zamir, and H. Czosnek. 1991. Tomato Yellow Leaf Curl Virus: A whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. *Virology* 185: 151-161.
- Navot, N., M. Zeidan, E. Picherski, D. Zamir, and H. Czosnek. 1992. Use of the polymerase chain reaction to amplify Tomato Yellow Leaf Curl Virus DNA infected plants and viruliferous whiteflies. *Phytopathology* 81: 1199-1202.
- Padidam, M., R.N. Beachy, and C.M. Fauquet. 1995. Tomato Leaf Curl Virus from India has a bipartite genome and coat protein is not essential for infectivity. *J. Gen Virol.* 76:25-35.
- Pico, B., M.J. Diez, and F. Nuez. 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to the Tomato Yellow Leaf Curl Virus-a review. *Sci. Horticult.* 67:151-196.
- Polston, J.E. and P.K. Anderson. 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western Hemisphere. *Plant Dis.* 81:1358-1369.
- Revill, P.A., C.V. Ha, S.C. Porchun, M.T. Vu, and J.L. Dale. 2003. The complete nucleotide sequence of two distinct geminiviruses infecting cucurbits in Vietnam. *Arch. Virol.* 146:1523-1541.
- Rojas, M.R., R.L. Gilbertson, D.R. Russell, and Maxwell. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis.* 77:477-485.
- Salati, R., M.K. Nakhla, M.R. Rojas, P. Guzman,,

- J. Jaquez, D.P. Maxwell, and R.L. Gilbertson. 2002. Tomato Yellow Leaf Curl Virus in the Dominican Republic: characterization of an infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. *Phytopathology* 92:487-496.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sudiono, S.H. Hidayat, R. Suseno, dan S. Sosromarsono. 2001. Deteksi molekuler dan uji kisaran inang virus Gemini asal tomat. Prosiding Kongres Nasional XVI dan Seminar Ilmiah PFI, Bogor, 22-24 Agustus 2001.
- Sulandari, S., R. Suseno, S.H. Hidayat, J. Harjosudarmo, dan S. Sosromarsono. 2001. Deteksi virus Gemini pada cabai di Daerah Istimewa Jogjakarta. Prosiding Kongres Nasional XVI dan Seminar Ilmiah PFI, Bogor, 22-24 Agustus 2001.