



**IDENTIFIKASI PENYEBAB PENYAKIT DAUN KECIL KACANG
PANJANG (*Cowpea Little Leaf Disease*) ISOLAT INDONESIA;
KAJIAN SIFAT BIOEKOLOGI DAN BIOMOLEKULER**

**TRI ASMIRA DAMAYANTI
DEDE SURYADI**

**DEPARTEMEN PROTEKSI TANAMAN
FAKULTAS PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

Latar Belakang

- Kacang panjang komoditas hortikultura penting
- Sumber protein, mineral, bergizi tinggi
- Produksinya berfluktuasi
- *Constraints* : gangguan OPT
- Negara tropis : infeksi virus
- Penyakit daun kecil kacang panjang

GEJALA PENYAKIT



Daun mengecil, melengkung ke bawah,
pinggiran daun menguning



Tan.sakit tidak
Menghasilkan kacang



Gejala sapu

Virus?

Fitoplasma?

OBJECTIVE

- Identifikasi virus penyebab penyakit daun kecil kacang panjang berdasarkan karakter bioekologi dan biomolekuler
- Mengetahui respons beberapa kultivar terhadap infeksi virus



Dasar penentuan strategi pengendalian penyakit

AKTIVITAS PENELITIAN

SURVEI

- Bogor
- Subang
- Indramayu
- Cirebon

BIOEKOLOGI

- Deteksi serologi
- Penularan
- Kisaran inang
- Propagasi
- Pengamatan partikel

BIOMOLEKULER

- Ekstraksi RNA
- cDNA
- RT-PCR
- Sequencing
- Anal. Filogenetik
- SDS-PAGE

RESPON KETAHANAN

- Putih super
- Dondot
- Lokal Bogor
- Hijau
- Usus Hijau
- 777
- Lorena
- Parade
- Brenero
- Sakura

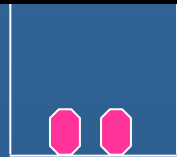
Tempat Penelitian : Lab. Virologi Tumbuhan
& RK. Cikabayan IPB

Tabel 1. SEBARAN & INCIDENCE

Lokasi	Σ Tanaman bergejala	Σ Tanaman yang diamati	KP (%)
DARMAGA BOGOR			
Babakan Lio	30	340	8.8
Cibeureum	57	1.120	5.0
Leuwikopo	22	188	11.7
Cikarawang	7	450	1.6
Darmaga	46	300	15.3
Kalurahan	11	2.800	0.4
Cisauklandeh	12	3.800	0.3
Cibatok	8	2.250	0.4
SUBANG			
Suka Asih	30	1.750	-
Juru Tilu	8	3.900	-
Babakan	1	1.900	-
Cibatu 1	16	3600	-
Cibatu 2	10	4250	-
INDRAMAYU			
Karanganyar	2	2.800	0.07
Majasari	6	1.600	0.38
Gadingan	2	1.700	0.12
Sliyeg	2	1.800	0.11
Segeran	2	1.620	0.12
CIREBON			
Bojongnegara	12	2.800	0.43
Pabuaran Wetan	2	3.850	0.05
Karang Wangun	10	1.600	0.63
Jati renggong	14	1.800	0.78

DETEKSI SEROLOGI

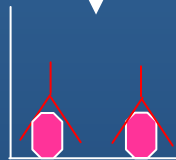
INDIRECT-ELISA



Antigen; o/n, 4°C



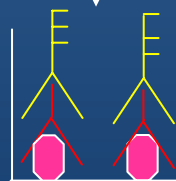
Washed 4x



1st Antibody ; 2-4 hr, 37°C



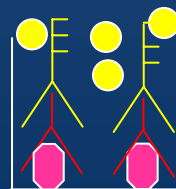
Washed 4x



2nd Antibody, 2-4 hr,
37°C

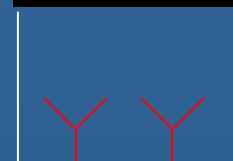


Washed 4x



Substrat PNP

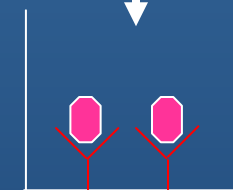
DAS-ELISA



1st Antibody o/n, 4°C



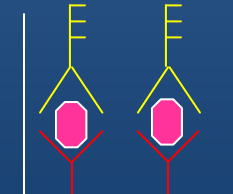
Washed 4x



Antigen; 2-4 hr, 37°C



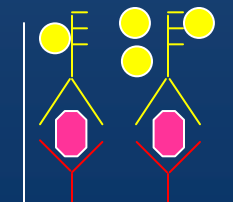
Washed 4x



2nd Antibody, 2-4 hr,
37°C



Washed 4x



Substrat PNP

ELISA reader

DETEKSI SEROLOGI

Negatif terhadap antisera virus yang menginfeksi kacang-kacangan

Tabel 2. Hasil deteksi serologi

Antisera	NAE* Tan.sehat	NAE Tan.Uji	Hasil
<i>Bean common mosaic virus</i> (BCMV)	0.115	0.128	-
<i>Bean yellow mosaic virus</i> (BYMV)	0.100	0.126	-
<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> (CaBMV)	0.107	0.086	-
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	0.145	0.131	-
<i>Soybean mosaic virus</i> (SMV)	0.100	0.116	-
General <i>Potyvirus</i> *	0.165	0.212	-

(+) : nilai absorbansi ELISA (NAE) \geq 2x NAE tanaman sehat

* : indirect-ELISA

PENULARAN

A. Penyiapan Tanaman Kacang Panjang

Pupuk kandang + tanah (1:1) →



B.1. Penularan Secara Mekanis



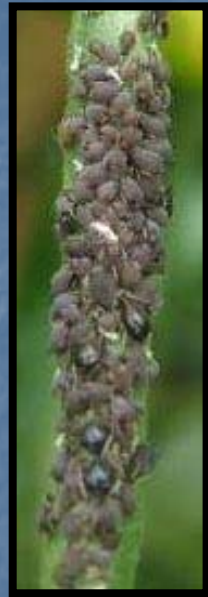
SAP



Pengamatan



B.2 Penularan dengan *Aphis craccivora*



2 hari



Nimfa



Akuisisi (1 hari)



Inokulasi (1 hari)

Pengamatan

B.3 Penularan dengan Penyambungan (*grafting*)



Transmission Mode

Tabel 3. Hasil Uji Penularan

Penularan	Masa inkubasi	Kejadian penyakit
Kontrol	-	0/10
Mekanis	-	0/10
Kutu daun (<i>Aphis craccivora</i>)	5	10/10
Penyambungan	9-15	5/10
Benih	?	?

? : Tidak diketahui karena tanaman terserang tidak menghasilkan polong

GEJALA HASIL PENULARAN VIRUS

Inokulum Awal



Mekanis



A. craccivora



Penyambungan

HUBUNGAN KUTUDAUN - VIRUS

Trial diulang 3 kali, 5 tanaman/ulangan, 10 ekor/tanaman



Inokulasi-H1

Inokulasi-H2

Inokulasi-H3



Gejala



(+)



(+)



(+)

Virus ditularkan *A. craccivora* secara **persisten**

Tabel 5. Kisaran inang Virus

Tanaman Uji	Masa Inkubasi (hari)	Incidence
Amaranthaceae		
<i>Gomphrena globosa</i>	-	0/10
Cucurbitaceae		
<i>Cucumis sativus</i>	-	0/10
Chenopodiaceae		
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-	0/10
Compositae		
<i>Ageratum conyzoides</i>	-	0/10
Solanaceae		
<i>Capsicum annuum</i>	-	0/10
<i>Lycopersicon esculentum</i>	-	
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-	0/10
<i>N. tabacum</i>	-	
<i>Solanum melongena</i>	-	0/10
<i>Datura stramonium</i>	7-12	7/10
Leguminosae		
<i>Arachis hypogea</i>	-	0/10
<i>Glycine max</i>	13-15	5/10*
<i>Pisum sativum</i>	11-16	8/10*
<i>Vigna angularis</i>	10-15	7/10
<i>Vigna radiata</i>	5-12	4/10*
<i>V. unguiculata</i>	5-14	5/10

* Sangat dipengaruhi kondisi lingkungan

Inang virus terbatas pada kacang-kacangan

GEJALA PADA INANG LAIN



Glycine max



Pisum sativum



Vigna unguiculata



Vigna angularis

Hasil inokulasi balik ke
kc.panjang: positif



Datura stramonium

PARTIKEL VIRUS

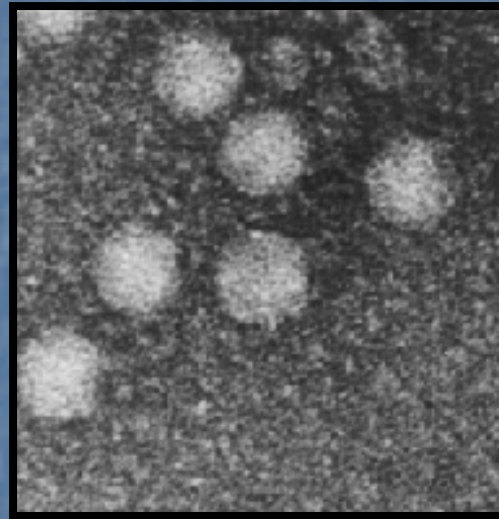
Sumber
inokulum



Propagasi



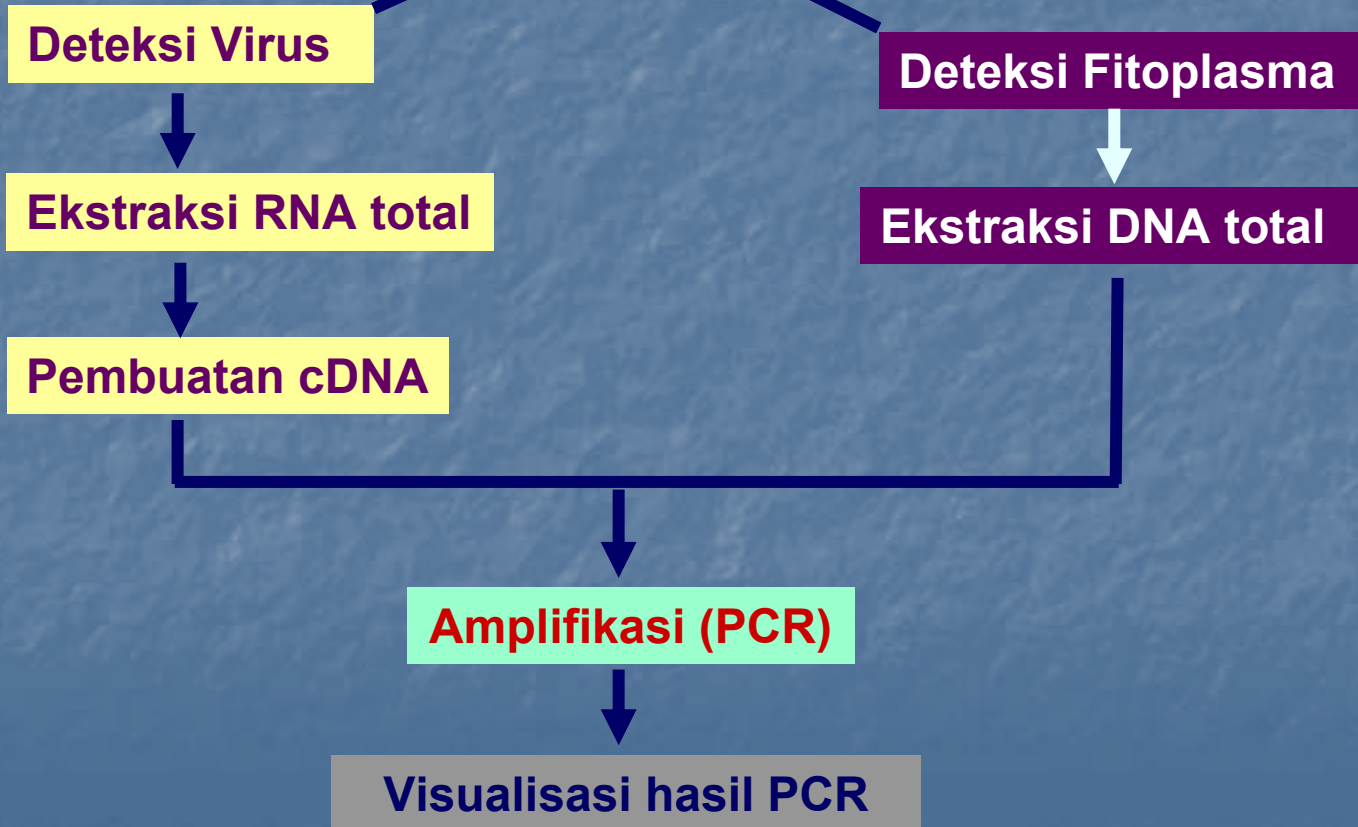
Purifikasi



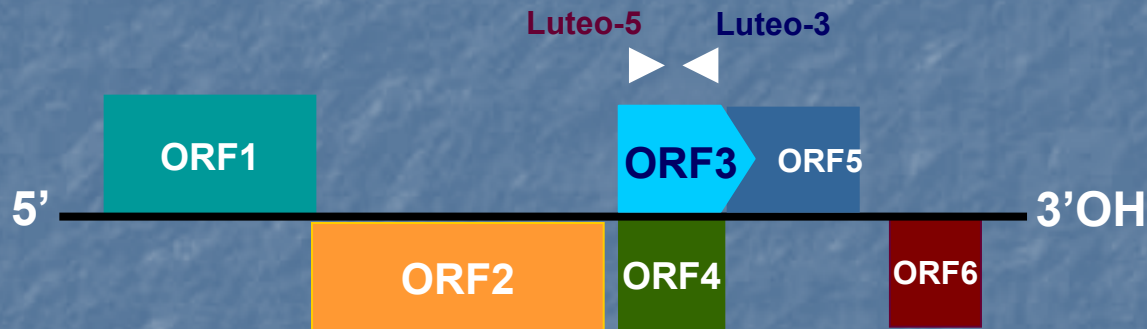
- Icosahedral
- $\Theta = 25-30 \text{ nm}$
- No envelope

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/WIntkey/Images/c2.gif>

BIOMOLEKULER



ORGANISASI GENOM LUTEOVIRIDAE

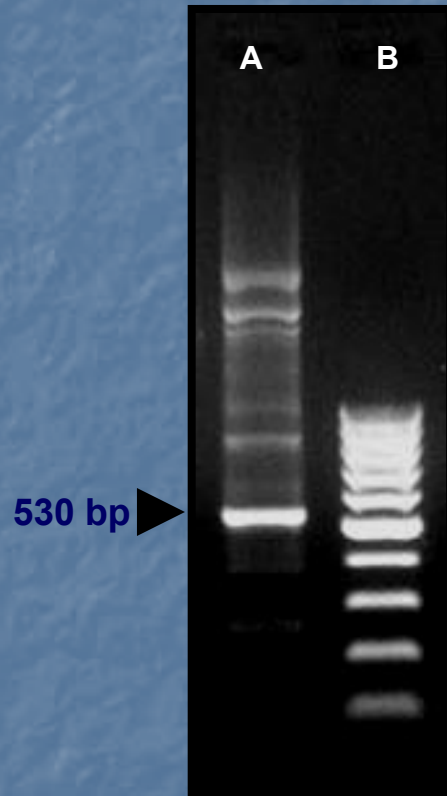


Deteksi virus : primer universal Luteovirus Luteo5/3. Ukuran DNA produk PCR 530 bp

Deteksi Fitoplasma : primer universal 16S rDNA spesifik fitoplasma P1/P7
Ukuran DNA produk PCR 1.800 bp

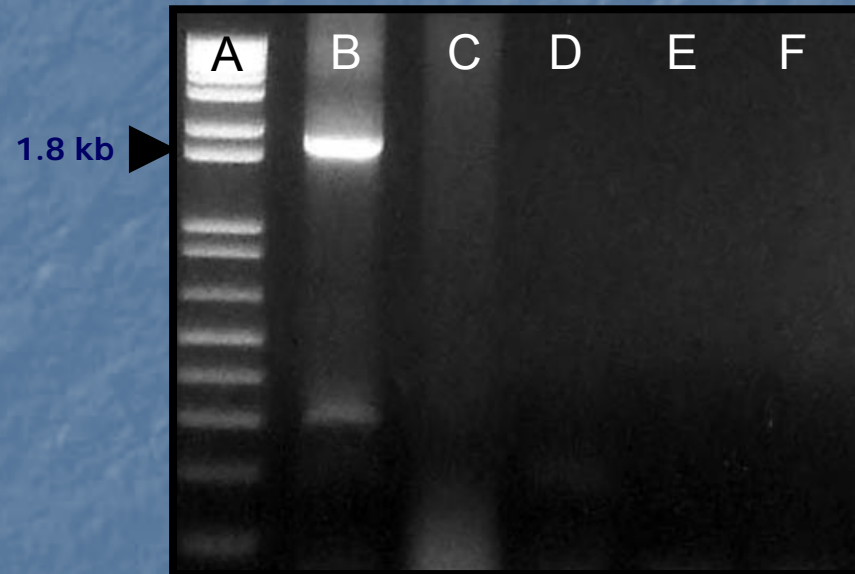
DETEKSI PCR

RT-PCR Virus



- A. **Sampel bergejala**
- B. Penanda DNA 100 bp

PCR Fitoplasma



- A. Penanda DNA 1 kb plus
- B. Kontrol Positif fitoplasma
- C. Sampel asal Bogor
- D. Sampel asal Indramayu
- E. Sampel asal Cirebon
- F. Sampel gejala sapu

HASIL BLAST SEKUEN

Tabel 6. Homologi sekuen virus daun kecil dengan virus lain dalam *Luteoviridae*

Virus	Homologi nukleotida	No.aksesi
<i>Cucurbit aphid-borne yellow virus</i> (CABYV) isolat C49	76	EF029115
<i>Groundnut rosette assistor virus</i> (GRV)	74	AF195502
<i>Potato leafroll virus</i> (PLRV)	71	AF453394
<i>Beet western yellow virus</i> (BWYV)	71	L799811
<i>Soybean dwarf virus</i> (SDV))	71	L20835

Pohon Filogenetik tidak dapat dibangun dengan program MEGA versi 4.0

Nama virus tentatif : **Cowpea little leaf virus** (CLLV) isolat Indonesia

RESPON KULTIVAR/GALUR KACANG PANJANG TERHADAP INFEKSI VIRUS



Kultivar : Putih Super, Dondot, Lokal Bogor, Hijau, Usus Hijau, 777, Lorena, Parade, Sakura, dan Brenero

Parameter pengamatan : pertumbuhan, masa inkubasi, kejadian penyakit, dan variasi gejala.

Tabel 7. Respons kultivar kacang panjang terhadap virus daun kecil kacang Panjang

Kultivar	Masa Inkubasi (hari)	KP= n/N ²⁾		% Penghambatan Tinggi Tanaman \pm SDEV*		Type gejala ³⁾	Respon ⁴⁾
		I	II	I	II		
Putih Super	12-21	16/20	11/20	23.8 \pm 29.4c	12.1 \pm 17.5cd	DK, KDL	R
Dondot	12-21	11/20	11/20	17.3 \pm 26.3c	6.9 \pm 14.4d	DKM	R
Lokal Bogor	5-9	20/20	15/20	43.6 \pm 25.6b	25.1 \pm 24.2bc	DK, KDL	SR
Hijau	5-21	14/20	12/20	20.5 \pm 24.2c	20.3 \pm 20.9bcd	DK, KDL	R
Usus Hijau	5-12	18/20	17/20	62.0 \pm 19.9a	59.5 \pm 21.8a	DK, KDL	SR
777	5-6	16/20	20/20	27.8 \pm 32.4c	20.3 \pm 28.0bc	DKM	SR
Lorena	5-8	20/20	20/20	25.3 \pm 10.8c	28.9 \pm 15.7b	DKM	SR
Parade	5	20/20	20/20	54.1 \pm 9.2ab	52.6 \pm 14.7a	DK, KDL	SR
Sakura	5-12	13/20	13/20	13.9 \pm 15.3c	22.9 \pm 24bc	DKM	R
Brenero	5-13	12/20	14/20	19.5 \pm 22.5c	13.8 \pm 18.1cd	DKM	R

*Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf 5%

1) Data sementara dari 2 kali ulangan percobaan. Tiap percobaan terdiri dari 20 tanaman Uji tiap kultivar

2) KP = n/N (Σ tanaman bergejala/ Σ tanaman uji)

3) DK, daun kecil; KDL, kerdil; DKM, daun kecil merambat

4) R, rentan; SR, sangat rentan

KESIMPULAN

- Penyebab penyakit daun kecil kacang panjang adalah **virus**, bukan fitoplasma atau interaksi keduanya
- Virus **hanya** dapat ditularkan oleh **kutudaun secara persisten**, **penyambungan** dan tidak dapat ditularkan secara mekanis
- Virus termasuk dalam genus **Luteovirus** dan inangnya terbatas pada tanaman kacang-kacangan (kc.kapri, hijau, merah, kedelai, tunggak) dan kecubung
- Semua kultivar uji **rentan** terhadap infeksi virus ini
- Nama tentatif virus : **cowpea little leaf virus** isolat Indonesia

UCAPAN TERIMAKASIH

- DIRJEN DIKTI atas kepercayaan dan dana penelitian
- LPPM IPB atas bantuannya
- Dr. Kikin HM atas pemberian primer universal fitoplasma
- Edi Supardi atas bantuan penelitian di rumah kaca



TERIMAKASIH