

Deteksi molekuler dan uji kisaran inang virus gemini asal tanaman tomat

Sudiono¹, Sri Hendrastuti Hidayat², Rusmilah Suseno², dan Soemartono Sosromarsono²

¹Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Lampung

²Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Jawa Barat. E-mail: hpt@bogor.wasantara.net.id

ABSTRACT

Geminivirus infection has been reported on various important crops, among others on tomato. Diseased plant were collected from six tomato growing areas in West Java (Bandung, Segunung, Darmaga, Ciloto, Cibeuying, and Cisaat) and one tomato field in Lampung (Bandar Lampung). The diseased plants showed various symptoms ranging from leaf curling, yellowing, and stunting. Polymerase chain reaction method using universal primers for geminiviruses successfully amplified a 1.5 kb DNA fragment from diseased plants from Bandung, Cisaat, Ciloto and Cibeuying. Host range study was conducted for two isolates of tomato infecting geminiviruses i.e. Bandung and Ciloto, using insect vector transmission. Out of ten plant species, six plant species (*Nicotiana benthamiana*, *Capsicum frutescens*, *Lycopersicon pimpinellifolium*, *Gomphrena globosa*, *Capsicum annum*, and *Lycopersicon esculentum*) showed symptoms with incubation period of 15-29 days and disease incidence of 20%-100% and three plant species (*Solanum nigrum*, *Cucumis sativus*, and *Phaseolus vulgaris*) were symptomless. Further study needs to be carried out to confirm the response of *Ageratum conyzoides* to geminivirus infection.

PENDAHULUAN

Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill) merupakan salah satu komoditi sayuran penting karena kandungan gizinya yaitu protein, karbohidrat, lemak, vitamin dan mineral. Permintaan terhadap tomat cenderung terus meningkat dari waktu ke waktu sejalan dengan meningkatnya rata-rata konsumsi tomat di beberapa negeri dan meningkatnya jumlah penduduk.

Villareal (1980) memperkirakan rata-rata konsumsi tomat di negeri-negeri tropis pada tahun 1965 sebesar 3,43 kg/kapita/tahun yang meningkat menjadi 6,13 kg/kapita/tahun pada tahun 1977. Sedangkan menurut prediksi FAO kebutuhan sayuran dan buah-buahan di Indonesia pada tahun 2000 adalah sebesar 82,35 kg/kapita/tahun. Di antara lebih kurang 400 jenis sayuran dan buah-buahan yang ada di Indonesia, tomat merupakan salah satu komoditi yang memberikan sumbangan keragaman gizi dan dapat menjadi sumber devisa yang menjanjikan. Permintaan terhadap komoditi tomat diperkirakan akan terus meningkat (Rukmana, 1994).

Epidemi penyakit virus merupakan kendala biologi utama dalam meningkatkan produksi tomat di dunia termasuk di Indonesia. Jones *et al.* (1991) melaporkan lebih dari 30 virus dapat menyerang tanaman tomat dan mengakibatkan kerugian yang cukup besar. Sedangkan di Indonesia ada 5 virus yang telah dilaporkan menyerang tanaman tomat yaitu: *tobacco mosaic virus* (TMV), *cucumber mosaic virus* (CMV), *potato virus Y* (PVY), *potato virus X* (PVX) dan *tomato ringspot virus* (TRSV) (Duriat, 1996).

Virus gemini telah dilaporkan tersebar di beberapa negeri, yaitu Israel, Brasil, Venezuela, Kuba,

Portugal, Tanzania, Thailand, USA, Afrika, Mexico, dan Karibia (Gusman *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1996; Louro *et al.*, 1996; Chiang *et al.*, 1997; Honda *et al.*, 1983; Zerbirin *et al.*, 1996; Wisler *et al.*, 1996; Polston, 1996; Pacheco *et al.*, 1996). Kerugian akibat serangan virus gemini juga telah banyak dilaporkan. *African cassava mosaic virus* misalnya menyebabkan kerugian hasil sebesar 70% di Afrika. Di Libanon dan Jordania kerugian akibat virus gemini pada tanaman tomat mencapai 50-70% (Bock *et al.*, 1977). Virus gemini di Indonesia telah dilaporkan menyerang tanaman tembakau (Trisusilowati, 1989), tanaman cabai (Rusli, 2000), dan tanaman tomat (Sugiartman & Hidayat, 2000).

Kerugian akibat serangan virus gemini di masa yang akan datang di suatu wilayah diharapkan dapat dikendalikan melalui deteksi virus secara dini yang merupakan salah satu taktik dalam strategi pengendalian preventif yang baik. Hal tersebut dapat terlaksana bila telah tersedia metode deteksi yang akurat dan cepat. Salah satu teknik molekuler yang potensial untuk dikembangkan sebagai alat deteksi dini adalah teknik *polymerase chain reaction* (PCR).

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan deteksi virus gemini pada tanaman tomat melalui kegiatan-kegiatan: (1) Pengumpulan sampel dan sumber inokulum virus gemini dari tanaman tomat, (2) Penggunaan teknik PCR untuk mendeteksi keberadaan virus gemini dan (3) Pengujian kisaran inang.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan mulai bulan November 1999 sampai dengan bulan Desember 2000 di Laboratorium Virologi Tumbuhan dan Rumah Kaca Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas

diisikan dalam sumuran jel dengan pipet mikro. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 75 V DC selama 90 menit. Hasil elektroforesis tersebut dilihat dengan transilluminator UV dan dipotret.

Pengujian kisaran inang

Perbanyakkan serangga vektor. Dalam pengujian kisaran inang dilakukan penularan dengan serangga vektor yaitu kutu kebul (*Bemisia tabaci*). Serangga dari lapang yang telah diidentifikasi dipelihara pada tanaman brokoli untuk mendapatkan keturunan yang bebas virus karena brokoli tidak termasuk inang virus gemini. Imago yang berkembang pada tanaman brokoli siap untuk dipergunakan sebagai vektor penular virus gemini.

Persiapan tanaman uji. Sebanyak 1-2 tanaman uji ditanam dalam polibeg yang diisi tanah gembur dan telah disterilkan. Jenis-jenis tanaman yang disiapkan

untuk uji kisaran inang terdapat pada Tabel 1. Tanaman uji ditanam dalam polibeg yang diisi tanah gembur dan telah disterilkan; sebanyak 1-2 tanaman per polibeg. Tanaman yang digunakan berumur 5-7 minggu setelah sebar benih. Inokulum virus gemini yang digunakan dipilih berdasarkan hasil deteksi pada bagian 2 dan tipe gejala yang ditimbulkan pada tanaman tomat terinfeksi. Jumlah tanaman uji untuk masing-masing jenis tanaman adalah sepuluh tanaman yang terdiri atas lima tanaman yang diinokulasi dan lima tanaman sebagai kontrol. Setelah dilakukan penularan tanaman uji ditempatkan di rumah kaca untuk diamati gejala penyakit dan perkembangannya. Peubah yang diamati yaitu masa inkubasi, gejala dan kejadian penyakit yaitu jumlah tanaman yang menunjukkan gejala dibandingkan jumlah tanaman yang diinokulasi seluruhnya.

Tabel 1. Jenis tanaman untuk uji kisaran inang virus Gemini

No.	Jenis tanaman	Famili	Umur tanaman saat inokulasi
1.	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Solanaceae	5 minggu
2.	<i>Lycopersicum pimpinellifolium</i>	Solanaceae	5 minggu
3.	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Solanaceae	7 minggu
4.	<i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae	7 minggu
5.	<i>Capsicum annuum</i>	Solanaceae	5 minggu
6.	<i>Capsicum frutescens</i>	Solanaceae	5 minggu
7.	<i>Cucumis sativus</i>	Cucurbitaceae	6 hari
8.	<i>Ageratum conyzoides</i>	Compositae	6 minggu
9.	<i>Gomphrena globosa</i>	Compositae	5 minggu
10.	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Leguminosae	6 hari

Penularan dengan serangga vektor. Serangga vektor dewasa (15-20 ekor/tanaman) diberi periode makan akuisisi pada tanaman tomat terinfeksi selama 24 jam. Kemudian serangga dipindahkan ke tanaman uji untuk periode makan inokulasi selama 24 jam. Setelah itu serangga dimatikan satu per satu, dan tanaman uji ditempatkan dan dipelihara di rumah kaca untuk diamati gejala dan perkembangan penyakit. Untuk perlakuan kontrol periode makan akuisisi dilakukan pada tanaman tomat yang sehat. Pada akhir percobaan uji kisaran inang dilakukan deteksi virus gemini menggunakan teknik PCR dengan Primer AC 1048 dan AV 494 yang diharapkan mengamplifikasi fragmen gen protein selubung dengan ukuran \approx 550 bp.

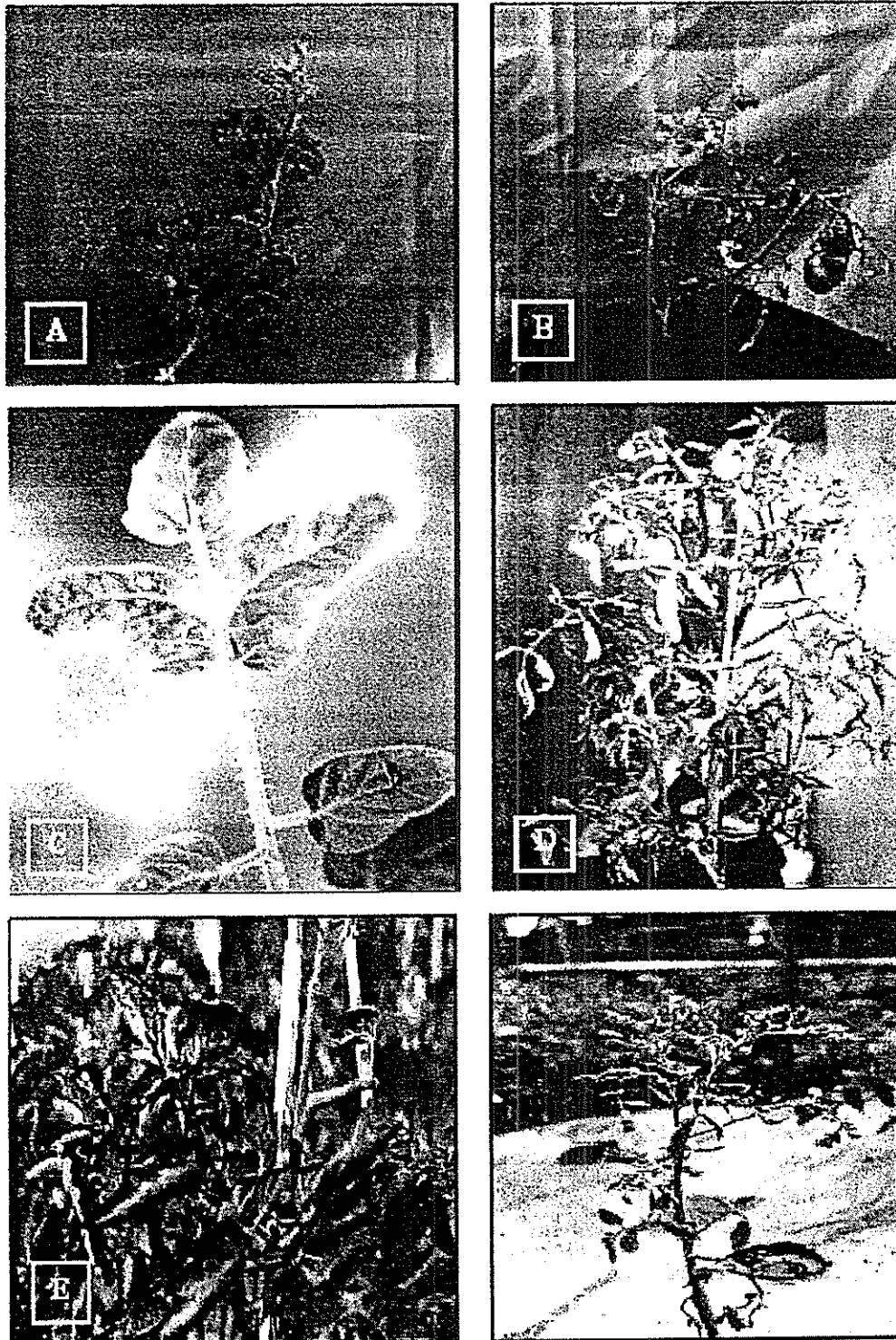
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengumpulan sampel dari lapangan

Tanaman tomat yang menunjukkan gejala infeksi virus gemini dikumpulkan dari beberapa tempat di

Jawa Barat (Bandung, Segunung, Darmaga, Ciloto, Cibeunying, Cisaat) dan Lampung (Bandar Lampung). Jenis tomat yang dikumpulkan dari Bandung dan Bandar Lampung adalah tomat ranti, sedangkan dari tempat lainnya adalah tanaman tomat varietas Artaloka. Pada ke tujuh lokasi tersebut tingkat kejadian penyakit yang diduga akibat serangan virus gemini berkisar dari 5-50% dan umumnya pertanaman tomat tersebut berdampingan dengan tanaman hortikultura lainnya seperti cabai, buncis, sawi dan lain-lain. Selain gejala khas infeksi virus gemini, pada lokasi tersebut juga ditemukan serangga yang diperkirakan *B. tabaci* dengan populasi cukup tinggi.

Tanaman tomat yang diduga terinfeksi virus gemini menunjukkan gejala berupa daun menggulung, tanaman kerdil, dan daun menguning, satu tanaman dapat terlihat lebih dari satu macam gejala. Variasi gejala yang ditimbulkan yaitu menggulung ke arah permukaan atas atau ke bawah, daun berkerut, daun tebal dan kaku, perubahan warna daun menjadi kuning



Gambar 1. Gejala pada tanaman tomat yang diduga terinfeksi virus gemini. Tanaman tomat berasal dari beberapa tempat (A. Bandung, B. Lampung, C. Ciloto, D. Darmaga, E. Segunung dan Cibeunying, F. Cisat)

Tabel 3. Hasil uji kisaran inang virus gemini sampel Bandung dan Ciloto melalui penularan dengan serangga vektor (*Bemisia tabaci*)

No	Jenis tanaman	Hasil uji penularan			
		Masa inkubasi (hari)	Kejadian penyakit		Gejala
			TR/TK	%	
Sampel Bandung					
1.	<i>Lycopersicum esculentum</i>	21	5/5	100	MG/KD
2.	<i>Lycopersicum pimpinellifolium</i>	29	5/5	100	MG
3.	<i>Nicotiana benthamiana</i>	16	4/5	80	MG/KD
4.	<i>Solanum nigrum</i>	-	TI	-	-
5.	<i>Capsicum annuum</i>	20	1/5	20	MG/KN
6.	<i>Capsicum frutescens</i>	26	2/5	40	KN/MG
7.	<i>Cucumis sativus</i>	-	TI	-	-
8.	<i>Ageratum conyzoides</i>	18	4/5	80	MG
9.	<i>Gomphrena globosa</i>	21	4/5	80	MG
10.	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	TI	-	-
Sampel Ciloto					
1.	<i>Lycopersicum esculentum</i>	28	3/5	60	MG/KN
2.	<i>Lycopersicum pimpinellifolium</i>	29	5/5	100	MG/KN
3.	<i>Nicotiana benthamiana</i>	24	5/5	100	MG/KD
4.	<i>Solanum nigrum</i>	-	TI	-	-
5.	<i>Capsicum annuum</i>	25	1/5	20	MG/KN
6.	<i>Capsicum frutescens</i>	20	1/5	20	MG
7.	<i>Cucumis sativus</i>	-	TI	-	-
8.	<i>Ageratum conyzoides</i>	-	TI	-	-
9.	<i>Gomphrena globosa</i>	15	3/5	60	MG
10.	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	TI	-	-

Keterangan: TR=jumlah tanaman terinfeksi, TK=jumlah tanaman yang diinokulasi, TI=tidak terinfeksi, MG=Menggulung, KD=Kerdil, KN=Menguning

Kejadian penyakit yang disebabkan oleh infeksi virus gemini sampel Ciloto pada tanaman uji menunjukkan hasil yang berbeda dengan virus gemini sampel Bandung. Kejadian penyakit tertinggi terjadi pada *L. pimpinellifolium* dan *N. benthamiana*, sementara kejadian penyakit terendah 20% terjadi pada *C. annuum* dan *C. frutescens*. Pada *L. esculentum* dan *G. globosa* kejadian penyakit mencapai 60%, sedangkan *A. conyzoides* tidak menunjukkan gejala.

Gejala yang ditimbulkan oleh infeksi kedua sampel virus gemini bervariasi yang berkisar dari daun menggulung ke atas, mosaik menguning, kerdil dan campuran di antaranya (Gambar tidak dipresentasikan). Gejala daun menggulung tampak pada semua tanaman uji yang terinfeksi oleh kedua sampel virus gemini. Kombinasi daun menggulung dan menguning tampak dominan pada infeksi virus gemini sampel Ciloto, yaitu pada tanaman tomat (*L. esculentum*), ranti (*L. pimpinellifolium*), dan cabai besar (*C. annuum*). Gejala yang sama ditimbulkan oleh infeksi virus gemini sampel Bandung pada tanaman cabai besar dan cabai rawit (*C. frutescens*).

Kombinasi daun menggulung dan tanaman kerdil muncul pada tanaman tomat yang terinfeksi virus gemini sampel Bandung, sedangkan pada tanaman tembakau (*N. benthamiana*) gejala yang sama muncul pada infeksi kedua sampel virus gemini.

Tanaman *S. nigrum*, *C. sativus*, *P. vulgaris* tidak menunjukkan reaksi positif, sehingga ketiga tanaman tersebut tidak termasuk inang virus gemini yang diteliti.

Pada akhir percobaan dilakukan pengujian dengan teknik PCR untuk menentukan tanaman uji tersebut benar-benar terinfeksi oleh virus gemini. Visualisasi produk pada gel agarose (1%) menghasilkan pita DNA berukuran ≈ 550 bp pada sampel tanaman yang menunjukkan gejala, kecuali *A. conyzoides*. Dari tanaman yang tidak menunjukkan gejala tidak diperoleh pita DNA hasil amplifikasi. Hasil PCR ini menunjukkan bahwa virus gemini dapat menginfeksi tanaman tersebut (Gambar 3). Primer yang digunakan adalah primer AC1048 dan AV494, yaitu primer yang mengamplifikasi fragmen gen protein selubung DNA virus gemini dengan ukuran yang diharapkan ≈ 550 bp. Wyatt & Brown

gejala dan satu tanaman yaitu *A. conyzoides* yang masih memerlukan pengkajian lebih lanjut. Keenam spesies tanaman yang menunjukkan gejala tersebut yaitu *C. frutescens*, *L. pimpinellifolium*, *G. globosa*, *C. annuum*, *N. benthamiana*, dan *L. esculentum*, merupakan tanaman-tanaman yang biasa dirotasikan atau ditanam secara tumpang sari pada lahan petani. Dengan mengetahui spesies tanaman yang dapat menjadi inang atau tidak dapat terinfeksi virus tersebut, maka strategi pengendalian penyakit misalnya melalui rotasi tanaman dengan tanaman bukan inang dapat dilakukan dengan benar.

KESIMPULAN DAN SARAN

- Gejala dan kejadian penyakit yang disebabkan virus gemini pada tanaman tomat di lapangan sangat bervariasi dengan gejala awal menggulung, menguning, dan kerdil.
- Berdasarkan uji PCR dengan primer universal (PAL1v 1978 dan PAR1c 715), tanaman tomat asal Bandung, Cisaat, Ciloto dan Cibeunying terinfeksi virus gemini.
- Penularan virus gemini pada tanaman inang melalui serangga vektor menunjukkan masa inkubasi antara 15-29 hari setelah inokulasi dan kejadian penyakit berkisar antara 20-100%. Virus sampel Bandung dan Ciloto memiliki kesamaan pada pengujian masa inkubasi tetapi berbeda pada kejadian penyakit dan gejala yang ditimbulkan. Gejala yang ditimbulkan pada tanaman kisaran inang bervariasi antara menggulung, kerdil, kuning atau campuran di antaranya.
- Nicotiana benthamiana*, *Capsicum frutescens*, *Lycopersicum pimpinellifolium*, *Gomphrena globosa*, *C. annuum*, dan *Lycopersicum esculentum* merupakan inang virus gemini asal tomat.

Perlu dilakukan pemetaan sebaran virus gemini di Indonesia, analisis sekuen DNA virus untuk mengetahui kekerabatan antar virus gemini Indonesia dengan virus gemini lain, dan pengembangan/penelitian tanaman tahan baik terhadap virus itu sendiri maupun vektor.

DAFTAR PUSTAKA

- Aidawati N. (2000). Penularan virus krupuk tembakau dengan *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae). Tesis. Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 48 pp.
- Bock KR, Gutric EJ, Meredith G & Baker H. (1977). RNA and protein component of Maize Streak Virus and Cassava Leaf Virus. *Annals Applied Biology* 85:305-308.
- Bos L. (1983). Introduction to plant virology. Logman, London and New York, 159 pp.
- Caciagli & Bosco D. (1997). Quantitation over time of Tomato Yellow Leaf Curl Geminiviruses DNA in its whitefly vector. *Phytopathology* 87:610-614.
- Chiang BT, Nakhla MK, Maxwell DP, Schoenfelder W. & Green SK. (1997). A new geminivirus association with a leaf curl disease of tomato in Tanzania. *Plant Disease* 81:1111 (abstract).
- Dellaporta SL, Wood J & Hicks JB. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Report* 1:19-21.
- Dhar AK & Singh RP. (1996). Geminiviruses In: Sing RP, Sing US & Kohmoto K. (eds.). Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases: Volume III Viruses and Viroid. p 289-309.
- Duriat AS. (1996). Pencegahan penyakit virus pada tanaman tomat. Prosiding Seminar Ilmiah Nasional Komoditas Sayuran. p. 575-581.
- Gusman PC, Arrendando CR, Emond D, Portillo RJ, Heinz & Giberstson RL. (1997). Partial characterization of two whiteflies transmitted geminiviruses infecting tomatoes in Venezuela. *Plant Disease* 81:312 (Abstract).
- Harrison BD. (1985). Advances in geminivirus research. *Annual Review Phytopathology* 23:55-82
- Honda Y, Iwahi M, Saito Y, Thongmeekom P, Kittisak K & Deema N. (1983). Mechanical transmission, purification and some properties of whitefly borne Mungbean Yellow Mosaic Virus in Thailand. *Plant Disease* 67:801-844.
- Jones JB, Stall RE & Zitter TA. (1991). Compendium of Tomatoes Diseases. APS Press. p.145-160
- Kato K, Onuki M, Fuji S & Hanada K. (1998). The first occurrence of tomato yellow leaf curl virus in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Annual Phytopathology Society Japan* 64:552-559.
- Louro D, Noris E, Verralt F & Accoto GP. (1996). First report Tomato Leaf Curl Virus in Portugal. *Plant Disease* 80:1079 (Abstract).
- Mathews REF. (1992). Fundamental of plant virology. Academic Press Inc. San Diego. 403 pp.
- Polston JE. (1996). Tomato geminiviruses in the Caribbean: their identification and management. *Phytopathology* 86:S71 (Abstract).
- Pacheco IT, Tiznado JAG & Brown JK. (1996). Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and Southern United States. *Phytopathology* 86:1186-1192
- Ramos PL, Guerra O, Dorestes V & Ramirez N.