

Pengaruh Konsentrasi Besi dalam Media Tanam pada Aktivitas *Pseudomonas putida* Pf-20 untuk Menginduksi Ketahanan Tembakau terhadap *Cucumber Mosaic Virus*

Effect of Iron Concentration in the Plant Medium on Pseudomonas putida Pf-20 Activity to Induce Tobacco Resistance to Cucumber Mosaic Virus

WIWIEK SRI WAHYUNI¹, RUDI YUTRIONO¹, SUGENG WINARSO²

¹Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, ²Jurusan Tanah, Faperta, Universitas Jember,
Jalan Kalimantan III/23, Jember 68121

Diterima 6 Januari 2003/Disetujui 3 Juli 2003

The capability of fluorescence pseudomonads to survive, colonize roots and dominate the rhizosphere is the important factor to succeed as a biological control agent. The use of iron concentration of 0, 10, 20, 30, 40 μM in Hoagland solution to water plants was to study its effect on the population growth of *P. putida* Pf-20 in the tobacco H877 rhizosphere, on the bacterial activity to induce tobacco resistance to CMV, and on the root growth. The results showed that bacterial population in the sand medium added with 20 μM iron concentration and inoculated with CMV was higher ($115.21 \times 10^3 \text{ cfu g}^{-1}$ dried sand) than that of medium either with 0, 10, 30, or 40 μM iron concentrations. The 20 μM iron concentration was also suitable for *P. putida* to induce tobacco resistance to CMV, which showed by the less disease severity of 15.40%. The more higher iron concentration added to the sand medium improved the root architecture and the total of root length, but the less population bacteria detected in the rhizosphere. The longest of the total of root length was on the medium added with 40 μM iron concentration.

PENDAHULUAN

Penyakit tanaman yang disebabkan oleh *cucumber mosaic virus* (CMV) sampai saat ini masih sulit dikendalikan karena virus ini mempunyai banyak jenis tanaman inang dan dapat disebarluaskan oleh vektor, biji, bahan perbanyakan tanaman, dan alat mekanis. Pengendalian penyakit CMV yang banyak dilakukan bersifat pencegahan misalnya penggunaan bibit tahan atau bebas virus, eradicasi tanaman terinfeksi, pengendalian vektor, dan proteksi silang (Palukaitis *et al.* 1992).

Usaha pengendalian penyakit oleh virus atau patogen lain dengan bakteri rizosfer dari golongan *plant growth-promoting rhizobacteria* (PGPR) sedang banyak diteliti. Tuzun dan Ku (1991), Maurhofer *et al.* (1994), Ongena *et al.* (1999) mengemukakan ada dua mekanisme pengendalian patogen yang dilakukan PGPR dari golongan pseudomonad, yaitu pembentukan antibiosis dan senyawa ekstraseluler.

Pseudomonas putida BTP1 selain menginduksi terbentuknya senyawa fenol-anticendawan juga membentuk siderofor penghasil molekul kelat besi sehingga substrat tumbuhnya menjadi cukup besi (Ongena *et al.* 1999, 2000). Siderofor inilah yang berperan dalam mekanisme *induced systemic resistance* (ISR). Dalam media pasir dengan konsentrasi

besi rendah (20 μM), siderofor PGPR dari golongan pseudomonad menghasilkan senyawa pioverdin, piokelin, asam salisilat (De Meyer & Hofte 1997), dan senyawa anticendawan (Ongena *et al.* 1999). Pada tembakau dan tomat yang diinfeksi oleh *tobacco necrosis virus* (TNV), ISR terjadi karena siderofor menghasilkan asam salisilat untuk mengaktifkan gen yang menyandikan *pathogenesis-related* protein (PR-protein) (Maurhofer *et al.* 1994, 1998). Diketahui pula *P. fluorescens* WCS lebih efektif mengendalikan penyakit layu *Fusarium* pada lobak bila konsentrasi besi tersedia rendah (Leeman *et al.* 1996).

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh penambahan konsentrasi besi pada media pasir tembakau Na-Oogst H877 terhadap (i) perkembangan populasi *P. putida* Pf-20 di rizosfer, (ii) aktivitasnya sebagai penginduksi ketahanan tembakau untuk melawan infeksi CMV, dan (iii) pertumbuhan akar tanaman tembakau.

BAHAN DAN METODE

Bahan. Benih tembakau Besuki Na-Oogst H877 direndam selama 48 jam dalam Triton X-100 1%, kemudian disemai dalam nampan plastik yang berisi tanah steril. *Pseudomonas putida* Pf-20 (koleksi T. Arwiyanto dari Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada) dibiakkan pada media pepton glukosa cair (5 g pepton, 10 g glukosa dalam 1000 ml H₂O),

*Penulis untuk korespondensi, E-mail: wahyuni@binanusa.net

setelah berumur 48 jam dibuat suspensi dengan cara pengenceran sampai kerapatan 10^8 CFU ml⁻¹. Isolat CMV-48 berasal dari tanaman tembakau Besuki Na-Oogst H382 koleksi Laboratorium Ilmu Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian UNEJ yang diperbanyak pada tembakau H382 sebagai sumber inokulum. Sebagai media tanam digunakan pasir steril sebanyak 3 kg per pot.

Rancangan Percobaan. Penelitian ini disusun dalam rancangan acak lengkap dengan 15 perlakuan yang terdiri atas kombinasi besi, bakteri *P. putida*, dan CMV. Konsentrasi besi dalam larutan Hoagland yang dicobakan ada 5 taraf, yaitu 0, 10, 20, 30, 40 μ M. Setiap perlakuan terdiri atas satu tanaman per pot. Rerata peubah hasil pengamatan antarperlakuan dibedakan dengan uji Duncan pada taraf 5%.

Konsentrasi Besi. Pada hari ke-2 setelah bibit diinokulasi bakteri, dilakukan penyiraman tiga kali dalam satu minggu dengan 250 ml larutan Hoagland yang dikondisikan mengandung konsentrasi besi sesuai perlakuan, yaitu 0, 10, 20, 30, 40 μ M. Tanaman dipelihara dengan penyiraman menggunakan air sampai kapasitas lapang.

***Pseudomonas putida*.** Tembakau (umur 35 hari) diinokulasi dengan *P. putida* melalui perendaman akarnya dalam suspensi bakteri selama 30 menit. Sebagai kontrol negatif digunakan tembakau yang akarnya tidak diinokulasi, tetapi hanya direndam dalam air suling selama 30 menit. Bibit selanjutnya ditanam pada media pasir.

Inokulasi CMV. Pada hari ke-7 setelah bibit diinokulasi bakteri, daun tembakau ke-3 dari bawah diinokulasi secara mekanis dengan CMV-48 (0.5 mg ml⁻¹ ekstrak daun sakit). Kontrol positif ialah tanaman yang diinokulasi dengan bakteri, tanpa CMV.

Pengamatan. Aktivitas *P. putida* Pf-20 untuk menginduksi ketahanan tembakau terhadap CMV ditunjukkan dengan tingkat keparahan penyakit. Pengamatan gejala CMV dilakukan setiap hari setelah inokulasi. Keparahan penyakit dinilai menurut Raupach *et al.* (1996) dengan skala k sebagai berikut: 0 = tidak tampak gejala; 1 = gejala ringan, 1-10% terlihat samar-samar; 2 = gejala sedang dan sistemik 11-30%; 3 = gejala jelas dan sistemik 31-60%; 4 = gejala sistemik > 60%.

$$K = \frac{\sum k \cdot N_k}{Z \cdot N} \times 100\%$$

K = keparahan penyakit, k = skala keparahan penyakit, N_k = jumlah tanaman dengan skala keparahan penyakit ke-k, Z = skala keparahan tertinggi, N = jumlah daun yang diamati.

Populasi bakteri di rizosfer tembakau dengan perlakuan bakteri dan CMV, serta bakteri tanpa CMV dihitung pada hari ke-30 setelah inokulasi bakteri. Sebanyak 10 g sampel pasir yang diambil secara acak dari setiap ulangan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer berisi 90 ml bufer fosfat 0.1 M, pH 7.0 yang mengandung pepton 0.1%, dikocok selama 30 menit kemudian didiamkan selama 5 menit. Fase bening diencerkan sampai 10^3 dan sebanyak 50 μ l dituangkan ke dalam media agar-agar Kings' B yang ditambah dengan sikloheksimida 100 ppm, dan diinkubasikan pada suhu kamar. Jumlah koloni dihitung secara kumulatif setelah 24 jam inkubasi dan dinyatakan dalam CFU g⁻¹ bobot pasir kering oven.

Total panjang akar tembakau dihitung menurut metode Newman (Hopkins 1995) hanya untuk tembakau yang diinokulasi bakteri, tetapi tidak diinokulasi CMV.

HASIL

Pengaruh Konsentrasi Besi terhadap Masa Inkubasi, Keparahan Penyakit CMV pada Tembakau dan Populasi Bakteri di Rizosfer. Variasi konsentrasi besi yang ditambahkan dalam media pasir berpengaruh terhadap masa inkubasi CMV (Tabel 1). Pada konsentrasi besi 0, 10, dan 30 μ M, gejala CMV muncul lebih awal pada tembakau yang diinokulasi dengan bakteri daripada kontrol, tetapi tidak demikian pada konsentrasi besi 20 dan 40 μ M. Konsentrasi besi 20 μ M memberikan masa inkubasi terpanjang yaitu 10 hari setelah inokulasi dengan CMV. Gejala CMV yang timbul pada daun-daun yang tumbuh setelah daun yang diinokulasi termasuk ke dalam kategori ringan sampai sedang.

Pada konsentrasi besi 10 μ M dan 20 μ M tingkat keparahan penyakit pada tembakau yang diperlakukan dengan atau tanpa bakteri lebih rendah daripada perlakuan lainnya, dan keparahan penyakit pada tembakau yang diperlakukan dengan bakteri lebih rendah dan berbeda nyata dengan tembakau tanpa bakteri. Tingkat keparahan penyakit terendah terdapat pada tembakau dengan bakteri pada media dengan konsentrasi besi 20 μ M, dan tertinggi pada tembakau tanpa bakteri pada media dengan konsentrasi besi 40 μ M (Tabel 2).

Populasi bakteri tertinggi dalam media pasir terdapat pada konsentrasi besi 20 μ M (Tabel 2). Pada konsentrasi ini populasi bakteri pada tembakau dengan perlakuan CMV (115.11×10^3 CFU g⁻¹ pasir kering) lebih tinggi daripada tembakau tanpa CMV (112.21×10^3 CFU g⁻¹ pasir kering). Secara umum populasi bakteri masih lebih tinggi pada tembakau dengan perlakuan CMV daripada tembakau tanpa CMV, tetapi pada media dengan konsentrasi besi 30 dan 40 μ M populasi bakteri pada tembakau dengan atau tanpa CMV tidak berbeda nyata.

Tabel 2 menunjukkan ada hubungan antara konsentrasi besi dalam media pasir dengan populasi bakteri di rizosfer tembakau dan tingkat keparahan penyakit CMV. Makin tinggi konsentrasi besi dalam media pasir, populasi bakteri menurun dan tingkat keparahan penyakit bertambah. Media dengan konsentrasi besi 20 μ M adalah yang terbaik untuk meningkatkan populasi *P. putida* dan aktivitasnya untuk menghambat perkembangan infeksi CMV sehingga tingkat keparahan penyakit lebih rendah.

Tabel 1. Pengaruh penambahan konsentrasi besi dalam larutan Hoagland pada media pasir terhadap masa inkubasi CMV pada tembakau yang diinokulasi dan tidak diinokulasi *Pseudomonas putida* Pf-20

Konsentrasi besi (μ M) dalam Larutan Hoagland	Masa inkubasi CMV (hari) pada Tembakau - Bakteri	Masa inkubasi CMV (hari) pada Tembakau + Bakteri
0	6.50	4.00
10	5.67	5.33
20	9.00	10.00
30	6.00	4.50
40	3.67	4.00

Tabel 2. Pengaruh penambahan konsentrasi besi dalam larutan Hoagland pada media pasir terhadap keparahan penyakit CMV dan populasi *Pseudomonas putida* Pf-20 di rizosfer tembakau berumur 65 hari

Konsentrasi besi (μM)	Tembakau dengan perlakuan	Keparahan penyakit (%)	Populasi bakteri ($\times 10^3 \text{ cfu g}^{-1}$ pasir kering)
0	- bakteri + CMV	35 b	0 f
	+ bakteri - CMV	0 j	73 e
	+ bakteri + CMV	23 f	94 cd
10	- bakteri + CMV	18 g	0 f
	+ bakteri - CMV	0 j	98 c
	+ bakteri + CMV	17 h	100 bc
20	- bakteri + CMV	17 h	0 f
	+ bakteri - CMV	0 j	112 ab
	+ bakteri + CMV	15 i	115 a
30	- bakteri + CMV	3 d	0 f
	+ bakteri - CMV	0 j	82 de
	+ bakteri + CMV	30 e	84 de
40	- bakteri + CMV	41 a	0 f
	+ bakteri - CMV	0 j	72 e
	+ bakteri + CMV	33 c	80 e

Angka yang diikuti dengan huruf berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata pada uji Duncan dengan taraf 5%

Pengaruh Konsentrasi Besi terhadap Arsitektur dan Total Panjang Akar. Makin meningkat konsentrasi besi yang ditambahkan pada media pasir mengakibatkan total panjang akar semakin meningkat (Tabel 3), demikian juga arsitektur akar menjadi semakin baik (Gambar 1). Pada konsentrasi besi 40 μM , panjang akar meningkat hampir tiga kali daripada yang tidak diberi besi, tetapi populasi bakterinya rendah (Tabel 2). Pada konsentrasi besi 20 μM , total panjang akar dan arsitektur akar cukup baik dan populasi bakterinya tinggi.

PEMBAHASAN

Masa inkubasi CMV pada tembakau H877 yang ditumbuhkan dalam media pasir dengan konsentrasi besi bervariasi, berkisar antara 4-10 hari. Meskipun ada sedikit perbedaan saat timbulnya gejala CMV pada tembakau dengan atau tanpa bakteri, tetapi tidak dapat dikatakan ada penundaan timbulnya gejala karena tidak diketahui apakah hal ini disebabkan oleh pengaruh dari bakteri, media pasir, atau konsentrasi besi. Pada kondisi umum di rumah kaca, dan tanpa perlakuan macam media dan bakteri, Wahyuni *et al.* (1992) dan Wahyuni dan Sulyo (1997) menemukan gejala CMV timbul pada 5-14 hari setelah inokulasi, bergantung pada suhu dan panjang hari, macam galur CMV, dan jenis tembakau yang diinokulasi. Sebaliknya Raupach *et al.* (1996) menemukan adanya penundaan timbulnya gejala sistemik mosaik oleh CMV pada kultivar ketimun rentan yang ditumbuhkan dalam media tanah dan diinfeksi oleh *P. fluorescens* 89B-27, yaitu sampai 7 hari dari saat timbulnya gejala yang umum. Ditemukan pula reaksi tanaman inang yang bervariasi dari tanpa gejala sampai cukup parah, sedangkan pada beberapa tanaman tidak menunjukkan gejala sampai pada hari ke-14 setelah diinokulasi dengan CMV.

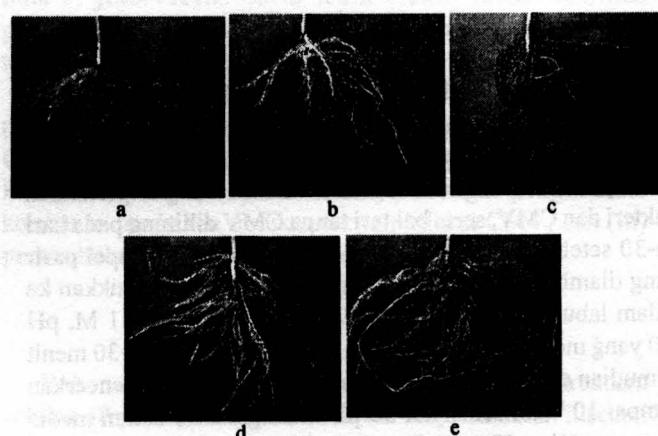
Galur CMV-48 pada inang asalnya, yaitu tembakau H382, memberikan gejala mosaik klorotik parah dan pada *N. glutinosa* dan *N. tabacum* cv. Xanthi nc. memberikan gejala mosaik klorotik parah disertai nekrosis pucuk yang sistemik

(Wahyuni & Sulyo 1997). Akan tetapi pada penelitian ini CMV-48 menghasilkan gejala mosaik samar sampai sedang pada tembakau H877. Pelemahan gejala CMV ini diduga disebabkan oleh jenis tembakau, pengaruh bakteri, media pasir dan konsentrasi besi, atau juga oleh faktor-faktor lain yang tidak diteliti. Dugaan ini didukung oleh penemuan Maurhofer *et al.* (1998) bahwa beberapa galur *P. fluorescens* memberikan sifat proteksi yang berbeda pada jenis tembakau yang diinokulasi dengan TNV. Pada media campuran pasir kuarsa dan tanah, *P. fluorescens* P3 (tipe SA negatif) memberikan proteksi parsial pada kultivar Xanthi nc. dengan mereduksi total lesio nekrotik oleh TNV 38-73%. *P. fluorescens* CHA0 (tipe penghasil SA) mereduksi total lesio nekrotik sampai lebih dari 80%. Akan tetapi tidak semua PGPR menghasilkan asam salisilat. Contohnya *P. putida* WCS358 (tipe penghasil pseudobaktin) pada media tanam yang ditambah Fe-tersedia pada konsentrasi rendah atau tinggi, tidak dapat menginduksi ISR dan tidak dapat menghasilkan asam salisilat *in vitro* (Raaijmakers *et al.* 1995). De Meyer dan Hofte (1997) menemukan bahwa asam salisilat dibentuk sejak *P. aeruginosa* 7NSK2 mengkoloniasi perakaran. Menurut Premono *et al.* (1996) proses kolonisasi *P. putida* pada perakaran jagung terjadi antara 15-20 hari setelah diintroduksikan ke media tumbuh dan populasinya stabil pada 20 sampai 40 hari, setelah itu menurun.

Populasi bakteri tertinggi dengan keparahan penyakit terendah (15.40%) terjadi pada konsentrasi besi 20 μM . Rendahnya keparahan penyakit ini sesuai dengan penemuan De Meyer dan Hofte (1997) dan Ongena *et al.* (2000) bahwa bakteri PGPR pada media yang mengandung 20 μM besi akan

Tabel 3. Pengaruh konsentrasi besi dalam media pasir terhadap total panjang akar tembakau berumur 65 hari dengan perlakuan bakteri tanpa CMV

Konsentrasi besi (μM) dalam larutan Hoagland	Total panjang akar (cm)
0	423
10	555
20	1039
30	1075
40	1135



Gambar 1. Pengaruh konsentrasi besi. a. 0 μM , b. 10 μM , c. 20 μM , d. 30 μM , e. 40 μM pada media pasir terhadap arsitektur perakaran tembakau H877 berumur 65 hari yang diperlakukan dengan bakteri tanpa CMV.

menghasilkan siderofor dalam jumlah yang cukup. Maurhofer *et al.* (1998) juga menemukan *P. fluorescens* CHA0 menurunkan ISR pada *N. tabacum* cv. *Xanthi nc*. dari infeksi TNV bila ketersediaan besi dalam media meningkat.

Secara umum pada 30 hari setelah tembakau diinokulasi bakteri, populasi bakteri dalam sampel pasir yang diambil secara acak dari rizosfer tembakau dengan CMV lebih tinggi daripada tembakau tanpa CMV, meskipun pada media dengan konsentrasi besi 30 dan 40 μM hal ini tidak berbeda nyata. Diperkirakan populasi bakteri yang diisolasi dari rizosfer tembakau tersebut dapat lebih tinggi lagi bila sampel pasir tidak diambil secara acak, tetapi pada kedalaman tertentu. Hal ini didukung oleh penemuan Leeman *et al.* (1995) bahwa populasi PGPR tertinggi berada pada kedalaman 0-10 cm, dan ini dicapai pada 2-2.5 bulan setelah bakteri diinokulasikan ke media tanam.

PGPR selain dapat menginduksi ketahanan juga dapat meningkatkan pertumbuhan akar tembakau termasuk akar rambut (Liu *et al.* 1995). Hal ini juga diamati pada pertumbuhan akar tembakau yang diperlakukan dengan konsentrasi besi bervariasi. Makin tinggi konsentrasi besi yang diberikan pada media pasir, makin baik arsitektur akar dan makin panjang total panjang akar tembakau. Tembakau dengan konsentrasi besi 40 μM mempunyai total panjang akar terpanjang dan ini ditunjukkan oleh lebih banyaknya akar rambut dibandingkan pada konsentrasi lain. Meskipun konsentrasi besi 30 dan 40 μM menurunkan populasi bakteri dan meningkatkan keparahan penyakit, tetapi menyebabkan arsitektur dan total panjang akar tanaman menjadi lebih baik. Kedua konsentrasi besi ini dapat menghambat aktivitas bakteri untuk membentuk siderofor. Hal ini didukung oleh penemuan Leeman *et al.* (1996) bila kandungan besi-tersedia dalam media tanam lebih tinggi dari 30 μM dapat menjadi toksik bagi bakteri sehingga pembentukan siderofor dihambat.

Dari serangkaian konsentrasi besi yang ditambahkan pada media tanam disimpulkan bahwa arsitektur dan total panjang akar cukup baik pada konsentrasi 20 μM . Pada konsentrasi ini, besi merupakan mikronutrisi baik bagi tembakau maupun PGPR. Perkembangan PGPR secara optimal di rizosfer dapat meningkatkan perannya sebagai penginduksi ketahanan tanaman terhadap patogen, seperti halnya *P. putida* BTP1 pada tanaman ketimun (Ongena *et al.* 1999, 2000) dan *P. fluorescens* WCS374 pada lobak (Leeman *et al.* 1995, 1996).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada I. Hartana, pakar tembakau Besuki Na-Oogst atas sarannya dan Hardian S. Addy dalam pengolahan data.

DAFTAR PUSTAKA

- De Meyer G, Hofte M. 1997. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induced resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology* 87:588-593.
- Hopkins GW. 1995. *Introduction to Plant Physiology*. Ontario: University Western Ontario.
- Leeman M, den Ouden FM, van Pelt JA, Dirkx FPM, Steijl H, Bakker PHAM, Schippers B. 1996. Iron availability affects induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 86:149-155.
- Leeman M, van Pelt JA, Hendricks MJ, Scheffer RJ, Baker PHAM, Schippers B. 1995. Biocontrol of *Fusarium* wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *Phytopathology* 85:1301-1305.
- Liu L, Kloepper JW, Tunzu S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: Duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology* 85:1064-1068.
- Maurhofer M, Hase C, Mauwly P, Metraux IP, Defago D. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to *Tobacco necrosis virus* by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* 84:139-146.
- Maurhofer M, Reimann C, Schmidli-Sacherer P, Heeb P, Haas S, Defago G. 1998. Salicylic acid biosynthetic gene expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against *Tobacco necrosis virus*. *Phytopathology* 88:678-684.
- Ongena M, Daay F, Jacques P, Thonart P, Benhamou N, Paulitz TC, Belanger RR. 2000. Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonads. *Plant Pathol* 49:23-30.
- Ongena M, Daay F, Jacques P, Thonart P, Benhamou N, Paulitz TC, Cornelis P, Koedam N, Belanger RR. 1999. Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent pseudomonads: predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. *Plant Pathol* 48:66-76.
- Palukaitis P, Roossinck MJ, Dietzgen RG, Francki RIB. 1992. Cucumber mosaic virus. *Adv Virus Res* 41:336-337.
- Premono EM, Moawad AM, Vlek PLG. 1996. Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Ind J Crop Sci* 11:13-23.
- Raaijmakers JS, Leeman M, van Oorschot MM, van der Sluis I, Schippers B, Bakker PAHM. 1995. Dose response relationships in biological control of *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 85:1075-1081.
- Raupach GS, Liu L, Murphy JF, Tuzun S, Kloepper JW. 1996. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against *Cucumber mosaic virus* using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Plant Dis* 80:891-894.
- Tuzun S, Ku J. 1991. *Plant Immunization: An alternative to Pesticides for Controlling Plant Disease in the Greenhouse or Field*. FFTC Book Series. Glen Osmond: CSIRO Division of Soil. hlm 30-40.
- Wahyuni WS, Dietzgen RG, Hanada K, Francki RIB. 1992. Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of *Cucumber mosaic virus*. *Plant Pathol* 41:282-297.
- Wahyuni WS, Sulyo Y. 1997. Identification and classification of sixteen CMV isolates from Java. Di dalam: *Proceeding 2nd Seminar on Current Status of Agricultural Biotechnology in Indonesia*. Jakarta, 13-15 Jun 1995. hlm 597-607.