

Penularan Fitoplasma Sapu pada Tanaman Kacang Tanah oleh Serangga Vektor *Orosius argentatus* dan Deteksi Molekuler dengan Teknik PCR

Transmission of Peanut Witches Broom Phytoplasma by Insect Vector *Orosius argentatus* and Its Molecular Detection using PCR Technique

Tatit Sastrini, Kikin Hamzah Mutaqin*
Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

ABSTRAK

Penyakit sapu yang disebabkan oleh fitoplasma dapat menyebabkan kehilangan hasil yang nyata pada kacang tanah (*Arachis hypogaea*). Penularan fitoplasma yang paling utama di lapangan ialah melalui serangga vektor. Penelitian ini bertujuan menentukan potensi wereng daun yang berada di pertanaman kacang tanah dalam menularkan fitoplasma dan sifat penularannya. Vektor wereng daun *Orosius argentatus* dan *Empoasca* sp. dipilih sebagai serangga uji. Metode yang digunakan meliputi uji hayati penularan fitoplasma masing-masing oleh *O. argentatus* dan *Empoasca* sp. (keduanya tergolong serangga Ordo Hemiptera, Famili Cicadellidae) dan mendeteksi fitoplasma dengan teknik PCR untuk mengonfirmasi asosiasi antara penyebab penyakit sapu (fitoplasma), vektor, dan gejala penyakit yang muncul pada tanaman. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gejala penyakit sudah muncul pada perlakuan menggunakan serangga penular *O. argentatus* 1 ekor per tanaman, sedangkan *Empoasca* sp. bukan merupakan vektor dari fitoplasma. Masa inkubasi fitoplasma pada inang semakin singkat dengan semakin banyaknya jumlah *O. argentatus* yang diberikan. Fitoplasma terdeteksi dengan teknik PCR menggunakan pasangan primer P1/P7 pada contoh tanaman yang bergejala dan tubuh wereng *O. argentatus* penularnya.

Kata kunci: *Empoasca* sp., polymerase chain reaction, wereng daun

ABSTRACT

Witches' broom disease caused by phytoplasma is a very serious disease on peanut (*Arachis hypogaea*) which may potentially lead to high yield loss. Insects are the most important agents of phytoplasma transmission in the field. The objective of this research was to examine the potential role of leafhoppers species as insect vector of phytoplasma and to determine their transmission characteristic. Two species of leafhopper i.e. *O. argentatus* and *Empoasca* sp. (both belong to Hemiptera: Cicadellidae) were chosen for this study. The methodology involved were transmission study of phytoplasma by *O. argentatus* and *Empoasca* sp., and molecular detection of phytoplasma by PCR technique to confirm the association of pathogen, insect vector and symptomatic plants. The result showed that specific symptom was observed when using *O. argentatus* in the transmission study with number of insect as low as 1 insect per plant, whereas *Empoasca* sp. was not able to transmit the disease. Incubation period of phytoplasma in the host plant was affected by the number of insect, i.e. the more insect vector the shortest incubation period. The phytoplasma was successfully detected using P1/P7 primer in symptomatic plants as well as in the insect vector.

Key words: *Empoasca* sp., leafhoppers, polymerase chain reaction

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Jalan Kamper, Bogor 16680.
Tel: 0251-8629364, Faks: 0251-8629362, Surel: kikinhm@yahoo.com

PENDAHULUAN

Fitoplasma telah dilaporkan sebagai penyebab penyakit penting pada beberapa tanaman pertanian (Wongkaew dan Fletcher 2004). Penyakit sapu yang disebabkan oleh fitoplasma merupakan salah satu penyakit penting pada pertanaman kacang tanah di Indonesia yang dapat menjadi salah satu penyebab rendahnya produktivitas kacang tanah dalam negeri. Menurut Nugroho (2000) penyakit sapu (*witches' broom*) dapat menurunkan bobot polong dari 41% sampai 100%. Sejauh ini, belum ada cara pengendalian yang efektif untuk fitoplasma penyebab penyakit sapu pada kacang tanah di lapangan.

Penularan fitoplasma dapat melalui serangga vektor, tali putri, dan penyambungan (D'Arcy dan Nault 1982; Weintraub dan Beanland 2006; Bertaccini dan Duduk 2009; Přibyllová dan Špak 2013). Serangga vektor adalah agens penular utama fitoplasma di lapangan. Di Pulau Jawa, Sumatera, dan Sulawesi *Orosius argentatus* (Hemiptera: Cicadellidae) menjadi vektor penyakit sapu pada beberapa tanaman kacang-kacangan, termasuk pada tanaman kacang tanah. Spesies lain dari famili Cicadellidae ialah *Empoasca* sp. yang dilaporkan menjadi vektor fitoplasma penyebab penyakit sapu pada kacang gude (*Cajanus cajan*) di Florida (McCoy *et al.* 1983), namun belum dilaporkan sebagai vektor fitoplasma pada kacang tanah. Informasi dan pemahaman tentang jenis-jenis serangga vektor, sifat-sifat penularan fitoplasma oleh vektor, dan identitas patogennya baik menggunakan pendekatan konvensional maupun molekuler merupakan dasar yang penting untuk penyusunan strategi pengendalian yang efektif.

Penelitian ini bertujuan menentukan potensi wereng daun yang berada di pertanaman kacang tanah dalam menularkan fitoplasma dan memperoleh informasi tentang sifat vektor terkait penularan serta pengaruhnya terhadap masa inkubasi penyakit dan kejadian penyakit pada kacang tanah.

BAHAN DAN METODE

Seleksi dan Pemeliharaan Wereng Daun

Wereng daun yang digunakan dalam uji penularan fitoplasma berasal dari pertanaman kacang tanah di sekitar kampus IPB Darmaga. Berdasarkan pengamatan dan pengambilan contoh, diperoleh beberapa jenis wereng daun. Hanya dua spesies wereng daun, yaitu *O. argentatus* dan *Empoasca* sp. (Gambar 1), yang populasinya paling tinggi di pertanaman serta mampu bertahan hidup dan berkembang biak setelah melalui proses pemeliharaan di dalam kurungan dengan inang tanaman kacang tanah. Hal ini menunjukkan bahwa tanaman kacang tanah merupakan inang bagi kedua jenis wereng daun tersebut. Perbanyakan wereng daun di laboratorium dilakukan untuk menghasilkan keturunan yang bebas fitoplasma atau patogen lainnya.

Penyiapan Tanaman dan Sumber Inokulum

Tanaman kacang tanah varietas Garuda sehat berumur 2 minggu diperoleh dari hasil penanaman sendiri. Tanaman kacang tanah bergejala penyakit sapu digunakan sebagai sumber inokulum. Tanaman tersebut diperoleh dari lahan kacang tanah di sekitar wilayah kampus IPB Darmaga. Tanaman dipelihara pada medium tanam campuran tanah dan pupuk kandang (2:1) pada pot ukuran 19 cm x 14 cm, kemudian diberi kurungan kasa berukuran 150 cm x 40 cm x 60 cm.

Uji Penularan Fitoplasma Menggunakan Wereng Daun

Bagian daun yang menunjukkan gejala penyakit sapu disungkup menggunakan kurungan (diameter 6 cm dan tinggi 12 cm), imago wereng daun *O. argentatus* dan *Empoasca* sp. generasi ke-2 yang dipelihara dan dibiakkan pada kurungan di laboratorium, dimasukkan ke dalam kurungan tersebut untuk melakukan periode makan akuisisi selama 3 hari pada tanaman sumber inokulum.

Tiga daun teratas tanaman kacang tanah sehat berumur 2 minggu disungkup menggunakan kurungan (diameter 6 cm dan tinggi

12 cm), wereng daun dengan jumlah masing-masing 1, 3, 5, dan 7 ekor per tanaman dimasukkan ke dalamnya untuk melakukan periode laten sekaligus periode makan inokulasi selama 3 hari. Periode makan akuisisi perlakuan kontrol menggunakan tanaman kacang tanah sehat dengan jumlah *O. argentatus* dan *Empoasca* sp. masing-masing 3 ekor per tanaman. Peubah pengamatan dalam penelitian ini ialah masa inkubasi penyakit dan kejadian penyakit (KP) yang dihitung berdasarkan pada:

$$KP = n/N \times 100\%, \text{ dengan}$$

n, jumlah tanaman bergejala; N, total jumlah tanaman uji.

Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Percobaan untuk uji penularan fitoplasma dirancang dengan rancangan acak lengkap yang terdiri atas 10 taraf perlakuan, yaitu penularan masing-masing dengan wereng daun *O. argentatus* dan *Empoasca* sp. 1, 3, 5, dan 7 per tanaman, serta perlakuan kontrol. Jumlah ulangan setiap perlakuan adalah 3 tanaman. Data dianalisis dengan program *statistical analysis system* versi 9.1.3 untuk *Windows*. Perlakuan yang berpengaruh nyata diuji lanjut dengan uji Duncan pada taraf nyata α 0.05.

Deteksi Fitoplasma Menggunakan Teknik PCR

Deteksi fitoplasma menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) terdiri atas tahapan ekstraksi DNA total, amplifikasi, dan visualisasi hasil (PCR).

Ekstraksi DNA Total

Ekstraksi DNA Total Tanaman. Ekstraksi DNA total dari tanaman dilakukan terhadap semua ulangan pada setiap perlakuan uji penularan yang dijadikan satu contoh komposit dan pada tanaman sumber inokulum. Sampel daun diambil saat tanaman menunjukkan gejala awal penyakit (pemendekan ruas daun dan terbentuknya daun-daun baru yang berukuran lebih kecil daripada kondisi normal). Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan metode

Dellaporta (1983) yang dimodifikasi, yaitu sebanyak 0.15 g contoh daun digerus dengan pistil yang berisi 1.5 mL bufer ekstraksi fitoplasma dingin ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, KH_2PO_4 , sukrosa, *polyvinylpyrrolidone*/PVP-10). Hasil gerusan dipindah ke dalam tabung mikro 2 mL dan disentrifugasi pada kecepatan 3000 x g (HettichMikro200R Centrifuge) selama 3 menit pada suhu 4 °C. Supernatan disentrifugasi 12 000 x g selama 25 menit pada suhu 4 °C. Endapan yang terbentuk diresuspensi dengan 0.75 mL bufer CTAB suhu 60 °C dan diinkubasi 15 menit, pada suhu 60 °C. Ke dalam suspensi, ditambahkan 0.75 mL kloroform/isoamil alkohol (24:1 v/v). Suspensi disentrifugasi pada 13 000 x g selama 5 menit. Lapisan epifase dipindahkan ke tabung mikro baru, kemudian dipresipitasi dengan isopropanol (-20 °C) dengan volume setara, tabung dibolak-balik beberapa kali. Inkubasi dilakukan pada suhu -20 °C, selama 30 menit. Suspensi disentrifugasi pada 13 000 x g, selama 5 menit, pada suhu 4 °C. Supernatan dibuang, endapan yang dihasilkan dicuci dua kali dengan 200 μ L etanol 70% dingin (-20 °C). Endapan DNA diresuspensikan dengan bufer TE sebanyak 25 μ L.

Ekstraksi DNA Total Wereng Daun.

Ekstraksi DNA total dari wereng daun dilakukan dengan metode Goodwin *et al.* (1994). Wereng dari setiap perlakuan yang telah melakukan periode inokulasi dikeluarkan dari kurungan dan dikumpulkan menjadi satu contoh komposit kemudian 3 ekor wereng dari masing-masing perlakuan diambil secara acak untuk ekstraksi DNA total. Wereng digerus menggunakan mikropistil dalam tabung mikro berisi 125 μ L bufer CTAB dengan sedikit serbuk kaca. Suspensi hasil gerusan dikocok, kemudian diinkubasi pada suhu 65 °C selama 5 menit. Ke dalam suspensi, ditambahkan campuran larutan kloroform:isoamil alkohol (24:1 v/v) dengan volume setara dengan suspensi yang diperoleh. Suspensi diinkubasi pada suhu kamar selama 20 menit, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10 000 x g selama 10 menit. Sebanyak 90 μ L supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikro baru,

kemudian DNA dipresipitasi dengan 10 μ L NaOAc 3 M pH 5.2 dan 250 μ L etanol absolut (-20 °C) dan diinkubasi pada suhu -20 °C selama 30 menit. Suspensi disentrifugasi pada 12 000 x g selama 15 menit. Supernatan dibuang, endapan yang dihasilkan dicuci 2 kali dengan 200 μ L etanol 70% (-20 °C). Endapan DNA diresuspensikan dengan 50 μ L bufer.

Deteksi Fitoplasma Menggunakan Teknik PCR. Deteksi fitoplasma dengan teknik PCR dilakukan untuk seluruh contoh DNA total yang diekstraksi dari tanaman sakit dari lapangan, tanaman uji hasil penularan dan wereng daun uji. DNA contoh hasil ekstraksi diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan mesin PCR (GeneAmp PCR System 9700) dengan sepasang primer oligonukleotida, yaitu P1 (5' AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT 3') (Deng dan Hiruki 1991) dan P7 (5' CGT CCT TCATCG GCT CCT 3') (Schneider *et al.* 1995) yang mampu mengamplifikasi sekuen DNA pada daerah seluruh gen 16S, *spacer region*, dan pangkal gen 23S rDNA dari umumnya fitoplasma dengan ukuran 1800 pb (Smart *et al.* 1996). Reaksi PCR dilakukan pada volume total 25 μ L, terdiri atas 1 μ L cetakan DNA (DNA *template*), 12.5 μ L 2X KAPA2G Fast ReadyMix, 9.5 μ L ddH₂O, 1 μ L primer *forward* (5 pmol), dan 1 μ L primer *reverse* (5 pmol). Proses PCR meliputi denaturasi awal pada 92 °C, 1 menit; 35 kali siklus denaturasi pada 95 °C, 1 menit, *annealing* pada 55 °C, 1 menit, dan ekstensi pada 72 °C, 1.5 menit; dan ekstensi akhir pada suhu 72 °C, 10 menit.

Visualisasi DNA Hasil Amplifikasi PCR dengan Elektroforesis Gel Agarosa

DNA hasil ekstraksi maupun PCR dielektroforesis dengan gel agarosa 1% dalam 2X bufer TAE yang mengandung etidium bromida pada 75 volt selama 35 menit. Hasil elektroforesis divisualisasi pada transiluminator UV untuk mengamati pita DNA yang terbentuk dan difoto dengan kamera digital yang dilengkapi filter oranye.

HASIL

Uji Penularan Fitoplasma Menggunakan Wereng Daun

Kejadian Penyakit dan Masa Inkubasi Fitoplasma. Penularan fitoplasma dengan wereng daun *O. argentatus* menunjukkan hasil positif untuk semua perlakuan dengan kejadian penyakit 100%, kecuali pada perlakuan kontrol. Masa inkubasi fitoplasma berkisar dari 21 sampai 67 hari (Tabel 1).

Gejala Penyakit Sapu. Tanaman uji hasil penularan dengan *Empoasca* sp. tidak menunjukkan gejala penyakit sapu. Perlakuan uji penularan fitoplasma dengan wereng daun *O. argentatus* dengan jumlah serangga 1, 3, dan 5 ekor per tanaman menimbulkan gejala berupa pembentukan daun-daun baru yang berukuran lebih kecil dan pemendekan ruas daun, sedangkan pada perlakuan dengan 7 ekor *O. argentatus* per tanaman gejala yang muncul berkembang sampai gejala lanjut dan menunjukkan gejala khas dari penyakit sapu berupa ginofor mengarah ke atas (geotrofisme negatif) yang menyebabkan tidak terjadinya pembentukan polong, pembentukan tunas-tunas samping dengan daun yang kecil, dan pembentukan struktur filodi (Gambar 2).

Deteksi Fitoplasma Menggunakan Teknik PCR. Hasil uji penularan dan deteksi fitoplasma menggunakan teknik PCR pada tanaman kontrol dan serangga yang digunakan untuk penularan menunjukkan hasil yang negatif. Hal ini menunjukkan bahwa tanaman kacang tanah sehat dan wereng daun yang digunakan untuk percobaan bebas dari fitoplasma.

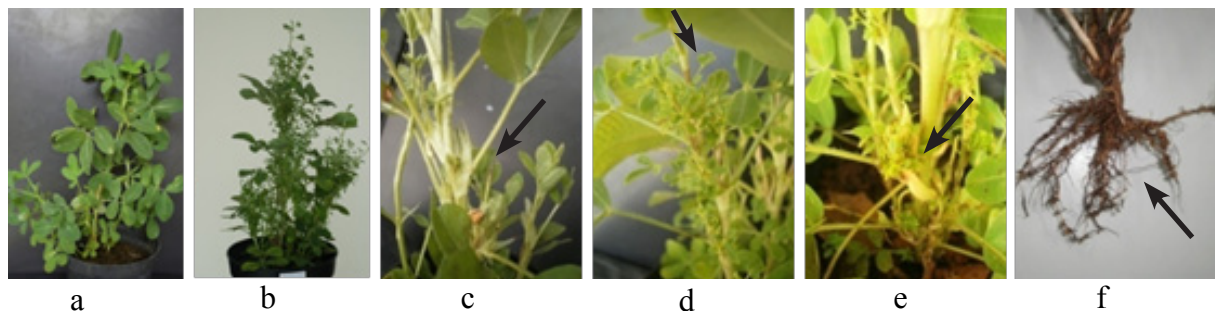
Fitoplasma terdeteksi pada contoh tanaman kacang tanah hasil penularan dengan *O. argentatus* yang sebelumnya telah melakukan periode akuisisi pada tanaman sumber inokulum dan pada wereng daun yang digunakan untuk penularannya. Fitoplasma tidak terdeteksi pada contoh tanaman kacang

Tabel 1 Kejadian penyakit dan masa inkubasi fitoplasma pada uji penularan dengan wereng daun *Orosius argentatus* dan *Empoasca* sp.

Serangga vektor	Jumlah vektor (ekor)	Kejadian penyakit		Masa inkubasi (HSP)
		Gejala/ulangan	Persentase	
<i>Orosius argentatus</i>	Kontrol	0/3	0	- ^a
	1	3/3	100	67.33 a
	3	3/3	100	61.33 a
	5	3/3	100	53.33 a
	7	3/3	100	21.33 b
<i>Empoasca</i> sp.	Kontrol	0/3	0	-
	1	0/3	0	-
	3	0/3	0	-
	5	0/3	0	-
	7	0/3	0	-

^a Tanaman uji tidak menunjukkan gejala sampai akhir pengamatan

Nilai rata-rata pada kolom yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata dengan uji selang berganda Duncan α 0.05



Gambar 2 Gejala penyakit sapu kacang tanah hasil penularan fitoplasma menggunakan *Orosius argentatus*. a, Tanaman kontrol; b, Tanaman menunjukkan gejala penyakit sapu; c, Ginofor mengarah ke atas (geotropisme negatif); d, Pembentukan tunas-tunas samping dengan daun yang kecil; e, Pembentukan struktur filodi; dan f, Tidak terbentuknya polong.

tanah hasil penularan dengan *Empoasca* sp. maupun pada tubuh wereng *Empoasca* sp. yang digunakan untuk penularan (Tabel 2). Hasil deteksi dengan teknik PCR yang positif ditandai dengan terbentuknya pita DNA berukuran 1800 pb (Gambar 3).

PEMBAHASAN

Pengukuran kejadian penyakit menunjukkan bahwa *O. argentatus* merupakan vektor yang efektif menularkan fitoplasma. Jumlah vektor berbanding terbalik dengan masa inkubasi. Hal ini terjadi karena pengaruh dari jumlah inokulum yang ditularkan ke dalam jaringan tanaman oleh vektor. Gejala yang teramati pada perlakuan uji penularan

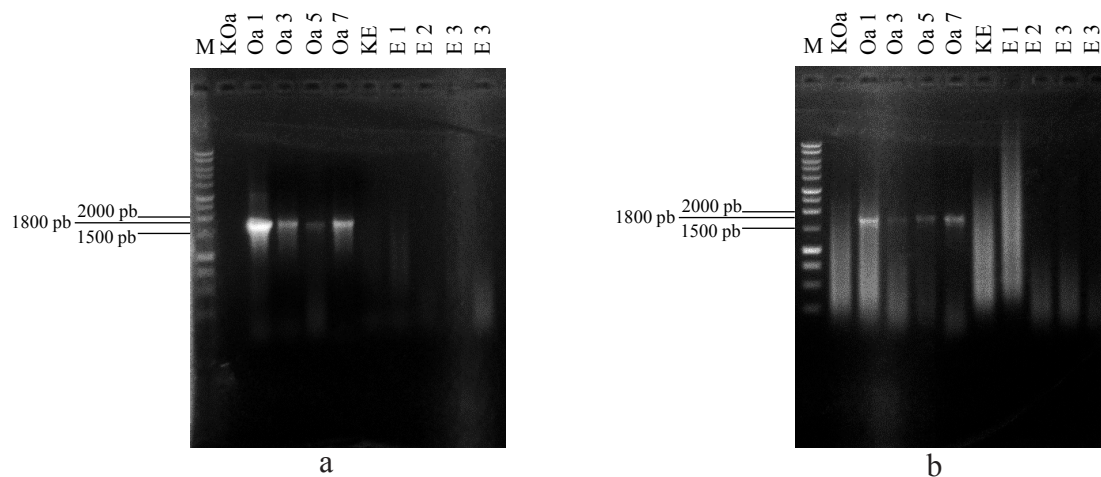
fitoplasma dengan wereng daun *O. argentatus* dengan jumlah serangga 1, 3, dan 5 ekor per tanaman tidak menimbulkan gejala lebih lanjut, seperti pada perlakuan 7 ekor per tanaman (Gambar 2). Hal ini kemungkinan juga terjadi karena jumlah fitoplasma yang ditularkan tidak mendukung untuk meningkatkan keparahan penyakit. Penyebaran dan perkembangan penyakit tanaman dipengaruhi oleh kepadatan inokulum yang ditularkan oleh aktivitas vektor serta kemampuan fitoplasma dalam proses sirkulasi dan berkembang biak pada tubuh vektor (D'Arcy dan Nault 1982; Weintraub 2007).

Menurut Iwaki *et al.* (1978) periode makan akuisisi minimum dari *O. argentatus* adalah 1 hari, periode makan inokulasi minimum 1 jam, dan periode laten fitoplasma

Tabel 2 Hasil deteksi fitoplasma pada contoh wereng dan tanaman uji dengan teknik PCR

Jenis vektor	Jumlah vektor (ekor)	Hasil PCR	
		Tanaman	Wereng
<i>Orosius argentatus</i>	Kontrol	-	-
	1	+	+
	3	+	+
	5	+	+
	7	+	+
<i>Empoasca</i> sp.	Kontrol	-	-
	1	-	-
	3	-	-
	5	-	-
	7	-	-

+, DNA fitoplasma positif teramplifikasi; -, DNA fitoplasma tidak teramplifikasi.



Gambar 3 Hasil deteksi fitoplasma dengan teknik PCR untuk berbagai contoh tanaman dan wereng daun. a, Contoh tanaman kacang tanah hasil uji penularan fitoplasma; b, Contoh wereng daun yang digunakan pada uji penularan fitoplasma; M, 1 kb ladder; K, Kontrol; Oa, *Orosius argentatus*; E, *Empoasca* sp.; 1,3,5,7, jumlah wereng daun.

dalam tubuh vektor sekitar 20–26 hari, dan serangga yang telah mengandung fitoplasma dapat menularkan sampai akhir masa hidupnya. Deteksi molekuler terhadap keberadaan fitoplasma pada contoh jaringan tanaman kacang tanah dan tubuh wereng pada uji penularan penting dilakukan untuk mengklarifikasi asosiasi antara penyebab penyakit sapu (fitoplasma), vektor, dan gejala yang muncul pada tanaman uji. Hasil deteksi keberadaan fitoplasma dengan teknik molekuler pada contoh tanaman dan wereng daun sesuai dengan uji penularan.

Gejala penyakit yang muncul pada perlakuan yang menggunakan serangga penular *O. argentatus* 1 ekor, 3 ekor, 5 ekor, dan 7 ekor

per tanaman berasosiasi dengan fitoplasma. Hal ini membuktikan bahwa *O. argentatus* merupakan vektor dari fitoplasma. *Empoasca* sp. bukan merupakan vektor dari fitoplasma karena gejala penyakit sapu tidak muncul pada tanaman uji hasil penularan dengan *Empoasca* sp. dan tidak berasosiasi dengan fitoplasma berdasarkan hasil deteksi secara molekuler.

Menurut Bertamini *et al.* (2002) dan Christensen *et al.* (2005) infeksi fitoplasma dapat mengganggu proses fisiologi dan biokimia, seperti translokasi fotosintat sehingga menyebabkan gangguan fisiologi berupa terganggunya keseimbangan hormon yang mengakibatkan munculnya gejala proliferasi, filodi, dan *virescens*.

Fitoplasma tidak dapat dibiakkan secara *in vitro* pada medium buatan maka cara mendeteksi fitoplasma menjadi sangat bergantung pada teknik molekuler, seperti PCR yang menggunakan DNA sebagai target deteksi. Teknik ini dapat digunakan untuk mendeteksi fitoplasma yang berada dalam jaringan tanaman dengan akurat karena bersifat sangat sensitif, hanya dengan satu molekul DNA saja maka proses amplifikasi sudah dapat terjadi (Marcone *et al.* 1997; Galetto dan Marzachi 2010). Ketersediaan cetakan DNA yang memiliki kualitas baik sangat penting dalam teknik PCR. Menurut Marzachi *et al.* (2004) keberhasilan teknik PCR sangat bergantung pada metode yang digunakan dalam mendapatkan DNA yang berkualitas baik. Beberapa teknik molekuler lain yang juga dapat digunakan untuk mendeteksi fitoplasma adalah *nested* PCR, analisis *randomly fragment length polymorphism* (RFLP) (Lee *et al.* 2004; Sertkaya *et al.* 2007). Berdasarkan pada uji penularan dan deteksi fitoplasma dengan teknik PCR, diketahui bahwa wereng daun yang berada pada pertanaman kacang tanah dan memiliki kemampuan menularkan fitoplasma penyebab penyakit sapu hanya spesies *O. argentatus*. Menurut Nielson (1968) dan Christensen *et al.* (2005), fitoplasma dan serangga vektor memiliki hubungan yang spesifik, artinya bahwa suatu spesies serangga hanya menularkan satu jenis fitoplasma.

DAFTAR PUSTAKA

- Bertaccini A, Duduk B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathol Mediterr.* 48:355–378.
- Bertamini M, Nedunchezian N. 2002. Phytoplasma [Stolbur-subgroup (Bois Noir-BN)] infection inhibits photosynthetic pigments, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and photosynthetic activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. *Chardonnay*) leaves. *Physiol Mol Plant Pathol.* 61(6):357–366. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/pmpp.2003.0449>.
- Christensen NM, Axelsen KB, Nicolaisen M, Schulz A. 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends Plant Sci.* 10(11):526–535. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2005.09.008>.
- D’Arcy CJ, Nault LR. 1982. Insect transmission of plant viruses and mycoplasma like and rickettsia like organisms. *Plant Dis.* 66:99–104. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PD-66-99>.
- Deng S, Hiruki C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *J Microbiol Methods.* 14(1):53–61. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90007-D](http://dx.doi.org/10.1016/0167-7012(91)90007-D).
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep.* 1(4):19–21. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02712670>.
- Galetto L, Marzachi C. 2010. Real-time PCR diagnosis and quantification of phytoplasma. Di dalam: Weintraub PG, Jones P, editor. *Phytoplasma Genomes, Plant Hosts and Vector.* Preston (UK): MPG Books Group. hlm 1–18.
- Goodwin PH, Xue BG, Kuske CR, Sears MK. 1994. Amplification of plasmid DNA to detect plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Ann Appl Biol.* 124(1):27–36. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7348.1994.tb04112.x>.
- Iwaki M. 1978. Identity of mycoplasma-like agents of legume witches broom in Indonesia. *CRIA Bogor.* 41:1–11.
- Lee IM, Martini M, Marcone C, Hu SF. 2004. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ for the phytoplasma associated with elm yellows. *J Syst Evol Microbiol.* 54:337–347. DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02697-0>.
- Marcone C, Ragozzino A, Seemuller E. 1997. Detection of bermuda grass white leaf disease in Italy and characterization of the associated phytoplasma by RFLP analysis. *Plant Dis.* 81(8):862–866. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.8.862>.

- Marzachi C, Milne RG, Bosco D. 2004. Phytoplasma–plant–vector relationships. Di dalam: Pandalai SG, Gayathri A, editor. *Recent Research Development in Plant Pathology*. Kerala (IN): Research Signpost. hlm 211–241.
- McCoy RE, Tsai JH, Norris RC, Gwin GH. 1983. Pigeon pea witches' broom in Florida. *Plant Dis*. 67:443–445. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PD-67-443>.
- Nielson MW. 1968. *The Leafhopper Vectors of Phytopathogenic Viruses (Homoptera: Cicadellidae) Taxonomy, Biology and Virus Transmission*. Washington (US): Dep. Agric Tech Bull.
- Nugroho S, Suseno R, Hidayat SH, Hidayat P. 2000. Evaluasi ketahanan beberapa varietas kacang tanah terhadap fitoplasma. *Bul HPT*. 12(2):48–52.
- Přibyllová, Špak J. 2013. Dodder transmission of phytoplasmas. *Methods Mol Biol*. 938:41–46. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2_4.
- Schneider BE, Seemuller CD, Smart BC, Kirkpatrick. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma like organisms or phytoplasma. Di dalam: Razin S, Tully JG, editor. *Molecular and Diagnostic procedures in Mycoplasmaology*. Volume ke-1. London (UK): Academic Pr.
- Sertkaya G, Martini M, Musetti R, Osler R. 2007. Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting sesame and solanaceous crops in Turkey. *Bull Insectol*. 60(2):141–142.
- Smart CD, Schneider B, Blomquist CL, Guerra LJ, Harisson NA, Ahrens U, Lorenz KH, Seemuller E, Kirkpatrick BC. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl Environ Microbiol*. 62(8):2988–2993.
- Weintraub PG. 2007. Insect vectors of phytoplasmas and their control an update. *Bull Insectol*. 60(2):169-173.
- Weintraub PG, Beanland L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annu Rev Entomol*. 51:1–111. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151039>.
- Wongkaew P, Fletcher J. 2004. Sugarcane white leaf phytoplasma in tissue culture: long-term maintenance, transmission, and oxytetracycline remission. *Plant Cell Rep*. 23:426–434. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-004-0847-2>.