

Identifikasi *Tomato infectious chlorosis virus* dan *Tomato chlorosis virus* melalui *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* dan Analisis Sikuen Nukleotida

Identification of *Tomato infectious chlorosis virus* and *Tomato chlorosis virus* by *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* and Nucleotide Sequence Analysis

Sari Nurulita, Gede Suastika*
Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

ABSTRAK

Insidensi penyakit klorosis mulai banyak ditemukan di daerah sentra produksi tomat di Jawa Barat. Pengamatan pada tanaman sakit menunjukkan adanya gejala menyerupai infeksi *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) dan *Tomato chlorosis virus* (ToCV). Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi TICV dan ToCV yang berasosiasi dengan penyakit klorosis pada tanaman tomat di daerah Jawa Barat (Cipanas, Lembang, Garut) melalui metode *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) dan analisis sikuen nukleotida. Berdasarkan hasil RT-PCR menggunakan primer spesifik TICV-CF/TICV-CR dan ToCV-CF/ToCV-CR diperoleh berturut-turut pita DNA berukuran 417 pb dan 360 pb dari sampel asal Cipanas. Sikuen nukleotida dari DNA produk RT-PCR tersebut memastikan bahwa penyakit klorosis pada tanaman tomat di Cipanas berasosiasi dengan infeksi TICV dan ToCV. Analisis homologi sikuen nukleotida dan filogenetika menunjukkan bahwa isolat TICV asal Cipanas berada dalam satu kelompok dengan isolat TICV asal Jepang dan Spanyol, sedangkan isolat ToCV asal Cipanas berada dalam satu kelompok dengan isolat ToCV asal Amerika.

Kata kunci: *Bemisia tabaci*, *crinivirus*, filogenetika, *Trialeuroides vaporariorum*

ABSTRACT

Tomato chlorosis disease was found more frequent on production area in West Java recently. Observation in the field showed typical symptoms of *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) and *Tomato chlorosis virus* (ToCV). The objective of this research is to identify TICV and ToCV associated with chlorosis disease on tomato plants in West Java (Cipanas, Lembang and Garut) using *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) method and nucleotide sequence analysis. DNA target of 417 bp and 360 bp was successfully amplified only from Cipanas sample using specific primers, TICV-CF/TICV-CR and ToCV-CF/ToCV-CR, respectively. Sequence analysis confirmed that chlorosis disease in Cipanas was associated with TICV and ToCV infection. Nucleotide sequence and phylogenetic analysis showed that TICV from Cipanas has high homology to and belongs to the same group with TICV from Japan and Spain; whereas ToCV from Cipanas has high homology to and belongs to the same group with ToCV from America.

Key words: *Bemisia tabaci*, *crinivirus*, phylogenetic, *Trialeuroides vaporariorum*

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

PENDAHULUAN

Tomat merupakan salah satu tumbuhan perdu *Solanaceae* yang rentan terhadap berbagai organisme pengganggu tanaman. Beberapa tahun terakhir ini penyakit baru yang disebabkan oleh *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) dan *Tomato chlorosis virus* (ToCV) mulai banyak ditemukan di pertanaman tomat di Indonesia (Hartono dan Wijonarko 2007). Infeksi TICV pertama kali muncul dan dilaporkan dari sejumlah tempat di negara bagian California, Amerika Serikat pada tahun 1993 (Duffus *et al.* 1996), sedangkan ToCV pertama kali ditemukan pada pertanaman tomat di bagian Utara Florida, Amerika Serikat sekitar tahun 1996 (Wintermantel dan Wisler 2006). Setelah itu, daerah sebar TICV dan ToCV dilaporkan semakin meluas meliputi beberapa negara di Eropa dan Asia (EPPO 2005).

Kedua virus, TICV dan ToCV, termasuk dalam genus *Crinivirus*, famili *Closteroviridae* (Wisler *et al.* 1998b ; Wintermantel dan Wisler 2006). Infeksi TICV dan ToCV menyebabkan gejala yang hampir sama pada tanaman di lapangan, yaitu menguning pada bagian interveinal daun (Duffus *et al.* 1996), bintik-bintik nekrotik kecil (Wintermantel dan Wisler 2006), mengeriting (Hirota *et al.* 2010), dan gejala lanjut dicirikan dengan warna daun merah kecokelatan (Wisler *et al.* 1998a). Walaupun gejala yang ditimbulkan tidak terdapat pada bunga dan buah, tetapi gejala yang terdapat pada daun dapat mengganggu proses fotosintesis. Hal ini menyebabkan penurunan produksi buah secara nyata (Wisler *et al.* 1998a). Penularan dan penyebaran kedua virus di lapangan terjadi melalui serangga vektor. Walaupun menyebabkan gejala yang hampir sama, TICV dan ToCV ditularkan oleh serangga vektor yang berbeda. *Tomato infectious chlorosis virus* hanya ditularkan oleh satu spesies serangga, yaitu *Trialeurodes vaporariorum* (Duffus *et al.* 1996), sedangkan ToCV dapat ditularkan oleh beberapa spesies kutukebul, yaitu *Bemisia tabaci*, *T. vaporarium* (Wintermantel dan Wisler 2006), dan *T. abutilonea* (Wisler *et al.* 1998b).

Insidensi penyakit klorosis mulai banyak ditemukan di daerah sentra produksi tomat di Jawa Barat di antaranya di daerah Cipanas, Lembang, dan Garut. Pengamatan pada tanaman sakit menunjukkan adanya gejala berupa menguningnya jaringan interveinal daun terutama pada daun di bagian bawah tanaman. Gejala lebih lanjut menunjukkan perubahan warna klorosis dari kekuningan menjadi merah kecokelatan pada daun. Penelitian dilakukan untuk mengidentifikasi TICV dan ToCV dari tanaman tomat.

BAHAN DAN METODE

Sampel daun tomat diambil dari daerah Jawa Barat, yaitu Cipanas, Lembang dan Garut.

Deteksi Virus dengan RT-PCR

Tahapan RT-PCR terdiri atas ekstraksi RNA total, sintesis *complementary* (c) DNA, amplifikasi DNA virus target, dan visualisasi hasil amplifikasi. Ekstraksi RNA total dilakukan menggunakan *Qiagen RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen Inc., Valencia–California, US). Sintesis cDNA dilakukan dengan menyiapkan bahan reaksi yang terdiri atas 3.2 μ L H₂O, 1 μ L bufer *reverse-transcription* 10x, 0.35 μ L DTT 50 mM, 2 μ L dNTP 10 mM, 0.35 μ L MMuLV, 0.35 μ L RNase inhibitor, 0.75 μ L oligo d(T) 10 mM, dan 2 μ L RNA total untuk setiap reaksi. Sintesis cDNA dilakukan pada mesin *thermal cycler* (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystem) dengan program 25 °C selama 5 menit, 42 °C selama 60 menit, dan 70 °C selama 15 menit.

Tahapan deteksi virus dilanjutkan dengan amplifikasi virus target, yaitu TICV dan ToCV, masing-masing menggunakan primer spesifik, yaitu TICV-CF (5'-AATCGGTAGTGACACGAGTAGCATC-3') dan TICV-CR (5'-CTTCAAACATCCTCCATCTGCC-3') untuk TICV dan ToCV-CF (5'-GTGTCAGGCCATTGTAAACCAAG-3') dan ToCV-CR (5'-CACAAAGCGTTTCTTTTCATAAGCAGG-3') untuk ToCV. Produk amplifikasi yang diharapkan adalah bagian selubung protein dengan ukuran

417 pb dan 360 pb, berturut-turut untuk TICV dan ToCV. Komposisi bahan dalam reaksi amplifikasi ialah 16.3 μL H_2O , 2.5 μL bufer 10x yang mengandung Mg^{2+} , 0.5 μL dNTP 10 mM, 2.5 μL *sucrose cresol* 10x, primer *forward* dan *reverse* masing-masing 1 μL , 0.2 μL *taq polymerase* 5U μL^{-1} , dan 1 μL cDNA sebagai *template*. Program amplifikasi terdiri atas 30 siklus dengan tahapan predenaturasi pada suhu 94 °C selama 4 menit, denaturasi (fase pemisahan utas DNA) pada suhu 94 °C selama 1 menit, *annealing* (pengintegrasian primer) pada suhu 62 °C selama 1 menit, *elongation* (sintesis untai DNA baru) pada suhu 72 °C selama 2 menit, dilanjutkan tahap pasca *extention* 72 °C selama 10 menit dan 4 °C untuk suhu penyimpanan. Visualisasi produk amplifikasi dilakukan menggunakan 1% gel agarosa dalam 0.5x bufer TBE (Tris-borate EDTA) dengan elektroforesis selama 60 menit pada 50 V.

Analisis Sikuen Nukleotida dan Filogenetika

Produk PCR dari masing-masing sampel dikirim ke PT Macrogen Inc. (Seoul, Korea) untuk dilakukan sikuensing nukleotida. Hasil sikuensing nukleotida kemudian digunakan untuk analisis kesejajaran dengan sikuen nukleotida TICV atau ToCV yang telah dipublikasikan di *GenBank* dengan program *basic local alignment search tools* (BLAST). Data sikuen nukleotida yang terpilih kemudian dimodifikasi dan analisis spesifisitas nukleotida dilakukan

dengan program *multiple alignment* pada *CluctalW BioEdit V.7.0.5* dan *CLC Seq Viewer V.0.2* sebelum dilakukan analisis filogenetika. Analisis filogenetika menggunakan program *CLC Seq Viewer V.0.2* berdasarkan pendekatan *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA).

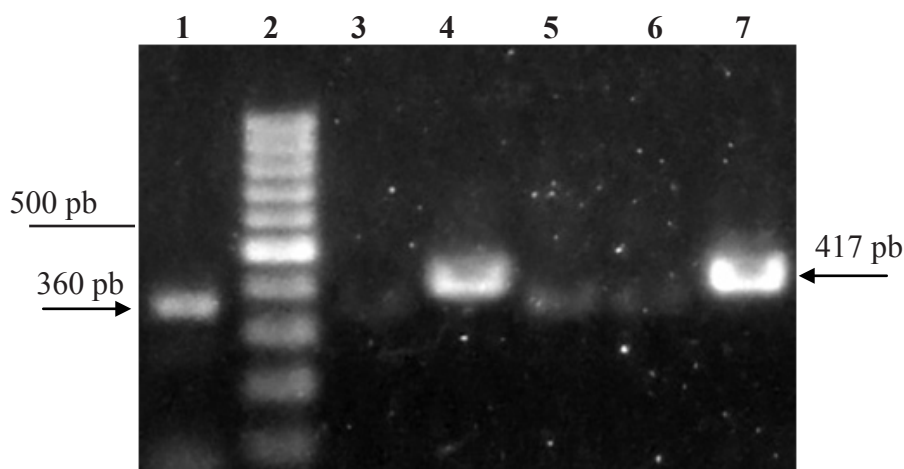
HASIL

TICV dan ToCV pada Tomat

Sampel daun tomat yang diambil dari daerah Cipanas, Lembang dan Garut menunjukkan gejala klorosis dengan jaringan interveinal mengalami penguningan. Deteksi dengan RT-PCR hanya berhasil mengamplifikasi pita DNA dari sampel asal Cipanas. Pita DNA berukuran ~400 pb dan ~360 pb didapatkan dari amplifikasi menggunakan pasangan primer berturut-turut TICV-CF/TICV-CR dan ToCV-CF/ToCV-CR (Gambar 1). Kedua pasang primer tersebut dirancang untuk mengamplifikasi bagian gen protein selubung masing-masing virus (Hirota *et al.* 2010). DNA hasil amplifikasi tersebut selanjutnya digunakan untuk sikuensing nukleotida.

Sikuen Nukleotida dan Filogenetika TICV

Analisis sikuen nukleotida dengan *ClustalW* menunjukkan bahwa gen protein selubung TICV asal Cipanas memiliki homologi yang tinggi dengan isolat-isolat TICV yang berasal dari negara lain seperti



Gambar 1 Pita DNA hasil amplifikasi menggunakan teknik RT-PCR dengan primer spesifik ToCV (kolom 1), TICV (kolom 3 s/d 7), dan penanda DNA 100 pb (kolom 2). Sampel terdiri atas sampel daun tomat asal Cipanas (1, 4, 7), Lembang (3), Garut (5 dan 6).

Amerika, Italia, Jepang, Perancis, dan Spanyol (Gambar 2). Hasil analisis penyejajaran sikuen nukleotida juga memperkuat hal tersebut, dengan nilai penyejajaran berkisar 99–100% yang mengindikasikan kemiripan sikuen nukleotida antarisolat yang sangat

tinggi (Tabel 1). Hasil penyejajaran asam amino isolat-isolat TICV juga menunjukkan hasil yang sama dengan penyejajaran sikuen nukleotida (Gambar 3). Oleh karena itu, dapat dinyatakan bahwa isolat TICV yang menginfeksi pertanaman tomat di Cipanas

AMERIKA	1:ACCTCAACTGACTTCTACACATTGTTTTAAAAATCGGTAGTGACACGAGTAGCATCAA	60
INDONESIA	1:ACCTCAACTGACTTCTACACATTGTTTTAAAAATCGGTAGTGACACGAGTAGCATCAA	60
ITALIA	1:ACCTCAACTGACTTCTACACATTGTTTTAAAAATCGGTAGTGACACGAGTAGCATCAA	60
JEPANG	1:ACCTCAACTGACTTCTACACATTGTTTTAAAAATCGGTAGTGACACGAGTAGCATCAA	60
PERANCIS	1:ACCTCAACTGACTTCTACACATTGTTTTAAAAATCGGTAGTGACACGAGTAGCATCAA	60
SPANYOL	1:ACCTCAACTGACTTCTACACATTGTTTTAAAAATCGGTAGTGACACGAGTAGCATCAA	60

AMERIKA	61:ACCTGTAATAAATGATGTGTTAATAGAAAAATAAAAAACCTTTGAAGATATCCTGGTTCGC	120
INDONESIA	61:ACCTGTAATAAATGATGTGTTAATAGAAAAATAAAAAACCTTTGAAGATATCCTGGTTCGC	120
ITALIA	61:ACCTGTAATAAATGATGTGTTAATAGAAAAATAAAAAACCTTTGAAGATATCCTGGTTCGC	120
JEPANG	61:ACCTGTAATAAATGATGTGTTAATAGAAAAATAAAAAACCTTTGAAGATATCCTGGTTCGC	120
PERANCIS	61:ACCTGTAATAAATGATGTGTTAATAGAAAAATAAAAAACCTTTGAAGATATCCTGGTTCGC	120
SPANYOL	61:ACCTGTAATAAATGATGTGTTAATAGAAAAATAAAAAACCTTTGAAGATATCCTGGTTCGC	120

AMERIKA	121:AGATGTTGAAGATCATAAAGACATAGAGGAAGATAGATCAAAATATGAACTACCTGACGT	180
INDONESIA	121:AGCTGTTGAAGATCATAAAGACATAGAGGAAGATAGATCAAAATATGAACTACCTGACGT	180
ITALIA	121:AGATGTTGAAGATCATAAAGACATAGAGGAAGATAGATCAAAATATGAACTACCTGACGT	180
JEPANG	121:AGCTGTTGAAGATCATAAAGACATAGAGGAAGATAGATCAAAATATGAACTACCTGACGT	180
PERANCIS	121:AGCTGTTGAAGATCATAAAGACATAGAGGAAGATAGATCAAAATATGAACTACCTGACGT	180
SPANYOL	121:AGCTGTTGAAGATCATAAAGACATAGAGGAAGATAGATCAAAATATGAACTACCTGACGT	180
** ,*****		
AMERIKA	181:AACGTCCTGAATTTCAACAGGAAGATAAGATAAAACAAGTGAGGTTGTATGACGTTTGGGA	240
INDONESIA	181:AACGTCCTGAATTTCAACAGGAAGATAAGATAAAACAAGTGAGGTTGTATGACGTTTGGGA	240
ITALIA	181:AACGTCCTGAATTTCAACAGGAAGATAAGATAAAACAAGTGAGGTTGTATGACGTTTGGGA	240
JEPANG	181:AACGTCCTGAATTTCAACAGGAAGATAAGATAAAACAAGTGAGGTTGTATGACGTTTGGGA	240
PERANCIS	181:AACGTCCTGAATTTCAACAGGAAGATAAGATAAAACAAGTGAGGTTGTATGACGTTTGGGA	240
SPANYOL	181:AACGTCCTGAATTTCAACAGGAAGATAAGATAAAACAAGTGAGGTTGTATGACGTTTGGGA	240

AMERIKA	241:TTGTGGTGGCAAATCTTCTCCACTTTAACCATTAACGCAAAATTTAAGCCTTTCAAATT	300
INDONESIA	241:TTGTGGTGGCAAATCTTCTCCACTTTAACCATTAACGCAAAATTTAAGCCTTTCAAATT	300
ITALIA	241:TTGTGGTGGCAAATCTTCTCCACTTTAACCATTAACGCAAAATTTAAGCCTTTCAAATT	300
JEPANG	241:TTGTGGTGGCAAATCTTCTCCACTTTAACCATTAACGCAAAATTTAAGCCTTTCAAATT	300
PERANCIS	241:TTGTGGTGGCAAATCTTCTCCACTTTAACCATTAACGCAAAATTTAAGCCTTTCAAATT	300
SPANYOL	241:TTGTGGTGGCAAATCTTCTCCACTTTAACCATTAACGCAAAATTTAAGCCTTTCAAATT	300
***** ,*****		
AMERIKA	301:TGTAGATATGGTTAACTTATTGCAGTTGIGGTATGGAGACTCAAAATCTAACAAITTTAGA	360
INDONESIA	301:TGTAGATATGGTTAACTTATTGCAGTTGIGGTATGGAGACTCAAAATCTAACAAITTTAGA	360
ITALIA	301:TGTAGATATGGTTAACTTATTGCAGTTGIGGTATGGAGACTCAAAATCTAACAAITTTAGA	360
JEPANG	301:TGTAGATATGGTTAACTTATTGCAGTTGIGGTATGGAGACTCAAAATCTAACAAITTTAGA	360
PERANCIS	301:TGTAGATATGGTTAACTTATTGCAGTTGIGGTATGGAGACTCAAAATCTAACAAITTTAGA	360
SPANYOL	301:TGTAGATATGGTTAACTTATTGCAGTTGIGGTATGGAGACTCAAAATCTAACAAITTTAGA	360

AMERIKA	361:GCTGTTGATACGTTATGATGAATCACAACGAGATAGATTGACACTTCAACTATGTAT	417
INDONESIA	361:GCTGTTGATACGTTATGATGAATCACAACGAGATAGATTGACACTTCAACTATGTAT	417
ITALIA	361:GCTGTTGATACGTTATGATGAATCACAACGAGATAGATTGACACTTCAACTATGTAT	417
JEPANG	361:GCTGTTGATACGTTATGATGAATCACAACGAGATAGATTGACACTTCAACTATGTAT	417
PERANCIS	361:GCTGTTGATACGTTATGATGAATCACAACGAGATAGATTGACACTTCAACTATGTAT	417
SPANYOL	361:GCTGTTGATACGTTATGATGAATCACAACGAGATAGATTGACACTTCAACTATGTAT	417

Gambar 2 Perbandingan sikuen nukleotida sebagian gen protein selubung TICV asal Cipanas-Indonesia, Amerika, Italia, Jepang, Perancis, dan Spanyol menggunakan program BioEdit V.7.0.5

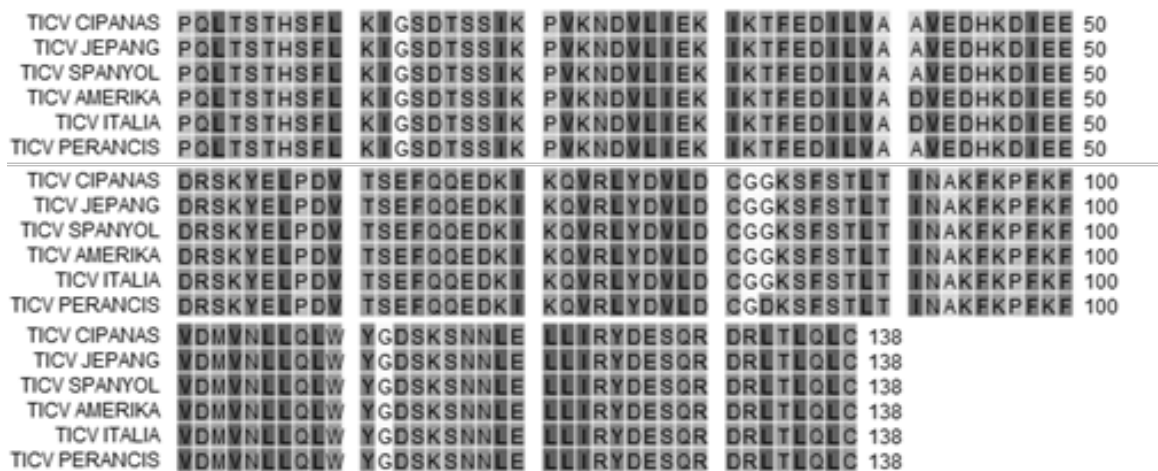
(selanjutnya disebut TICV isolat Indonesia) kemungkinan adalah spesies yang sama dengan TICV dari Amerika, Italia, Jepang, Perancis, dan Spanyol.

Analisis filogenetika pada kladogram menunjukkan bahwa hubungan kekerabatan keenam isolat tersebut terbagi menjadi dua kelompok (Gambar 4). Kelompok pertama terbagi menjadi dua subkelompok, yaitu subkelompok I yang terdiri atas isolat asal

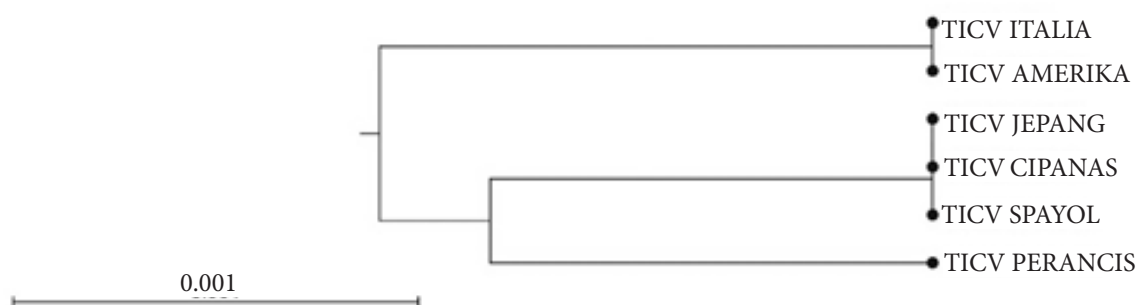
Jepang, Spanyol, dan Indonesia; sedangkan subkelompok II hanya terdiri atas isolat asal Perancis. Kelompok kedua terdiri atas isolat asal Amerika dan Italia. Kedekatan hubungan kekerabatan isolat TICV asal Indonesia dengan isolat TICV asal Jepang dengan homologi 100% sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yang dilaporkan oleh Hartono dan Wijonarko (2007).

Tabel 1 Tingkat kesamaan sikuen nukleotida sebagian gen protein selubung TICV asal Indonesia, Amerika, Italia, Jepang, Perancis, dan Spanyol

No akses	Asal isolat	Tingkat kesamaan (%)					
		Indonesia	Amerika	Italia	Jepang	Perancis	Spanyol
-	Indonesia	-					
FJ815441	Amerika	99	-				
EU881362	Italia	99	100	-			
AB085603	Jepang	100	99	99	-		
DQ355217	Perancis	99	99	99	99	-	
FJ542305	Spanyol	100	99	99	100	99	-



Gambar 3 Penyejajaran asam amino TICV isolat asal Cipanas dengan isolat asal Jepang, Spanyol, Amerika, Italia, dan Perancis menggunakan program CLC Seq Viewer V.7.0.2.



Gambar 4 Pohon filogenetika berdasarkan sikuen nukleotida sebagian gen protein selubung isolat-isolat TICV asal Cipanas-Indonesia, Amerika, Italia, Jepang, Perancis, dan Spanyol menggunakan program CLC Seq Viewer V.7.0.2.

Sikuen Nukleotida dan Filogenetika ToCV

Analisis sikuen nukleotida menunjukkan bahwa gen protein selubung ToCV asal Cipanas memiliki homologi yang tinggi dengan isolat-isolat TICV yang berasal dari negara lain seperti Amerika, Jepang, dan Perancis (Gambar 5). Hasil analisis penyejajaran sikuen nukleotida menunjukkan bahwa isolat ToCV asal Cipanas memiliki nilai penyejajaran yang tinggi, yaitu 98–100%, dengan ToCV dari Jepang, Perancis, dan Amerika (Tabel 2). Hasil penyejajaran asam amino juga menunjukkan hasil yang sama dengan penyejajaran sikuen nukleotida (Gambar 6). Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa isolat ToCV yang menginfeksi pertanaman tomat di Cipanas (selanjutnya disebut ToCV isolat Indonesia) kemungkinan adalah spesies yang sama dengan ToCV dari Amerika, Jepang, dan Perancis. Lebih lanjut, analisis filogenetika menunjukkan bahwa kekerabatan isolat ToCV

asal Amerika dan Jepang lebih dekat dengan isolat ToCV asal Indonesia dibandingkan dengan ToCV asal Perancis (Gambar 7).

PEMBAHASAN

Penyakit klorosis yang disebabkan oleh TICV dan ToCV dilaporkan menyebabkan penurunan produksi tomat yang cukup nyata sejak awal 1990 di beberapa negara bagian di Amerika Serikat terutama California dan Florida (Duffus *et al.* 1996, Wisler *et al.* 1998a, Wintermantel dan Wisler 2006). Daerah persebaran TICV dan ToCV saat ini semakin meluas hingga ke Eropa dan Asia, meliputi beberapa negara seperti Italia (Wisler *et al.* 1998a), Yunani (Dovas *et al.* 2002), Spanyol (Lozano *et al.* 2006), dan Taiwan (Tsai *et al.* 2004). Penyakit klorosis pada tanaman tomat di Indonesia pertama kali dilaporkan oleh Hartono dan Wijonarko (2007) di daerah

INDONESIA	1:	ATATCTACCTTGACTCAGGAAGAGGATAAGATACTGAACCTTTGCGCGATATCGGTAGACC	60
JEPANG	1:	ATATCCACCTTGACTCAGGAAGAGGATAAGATACTGAACCTTTGCGCGATATCGGTAGACC	60
PERANCIS	1:	ATATCTACCTTGACTCAGGAAGAGGATAAGATACTGAACCTTTGCGCGATATCGGTAGACC	60
AMERIKA	1:	ATATCTACCTTGACTCAGGAAGAGGATAAGATACTGAACCTTTGCGCGATATCGGTAGACC	60

INDONESIA	61:	GACTAAATTTTCGTTTTCTCAGTCTATGTGTGTCAGGCCATTGTAARCCAAGGGACCTCAGTT	120
JEPANG	61:	GACTAAATTTTCGTTTTTCAGTCTATGTGTGTCAGGCCATTGTAARCCAAGGGACCTCAGTT	120
PERANCIS	61:	GACTAAATTTTCGTTTTCTCAGTCTATGTGTGTCAGGCCATTGTAARCCAAGGGACCTCAGTT	120
AMERIKA	61:	GACTAAATTTTCGTTTTCTCAGTCTATGTGTGTCAGGCCATTGTAARCCAAGGGACCTCAGTT	120

INDONESIA	121:	AAAGCAGCCGGTAATAACAGTCTTGAAAACCTACTTTGAGGTAGATGGTGCGAGATTTAAT	180
JEPANG	121:	AAAGCAGCCGGTAATAACAGTCTTGAAAACCTACTTTGAGGTAGATGGTGCGAGATTTAAT	180
PERANCIS	121:	AAGGCAGCCGGTAATAGCAGTCTTGAAAATCTACTTTGAGGTAGATGGTGCGAGATTTAAT	180
AMERIKA	121:	AAAGCAGCCGGTAATAACAGTCTTGAAAACCTACTTTGAGGTAGATGGTGCGAGATTTAAT	180
		**	
INDONESIA	181:	GGAAAACCTCCGGATTTGATAAATGAGGTTAGACCCAAATGTCCGATGTTCCAAACGCTA	240
JEPANG	181:	GGAAAACCTCCGGATTTGATAAATGAGGTTAGACCCAAATGTCCGATGTTCCAAACGCTA	240
PERANCIS	181:	GGAAAACCTCCGGATTTGATAAATGAGGTTAGACCCAAATGTCCGATGTTCCGAAACGCTA	240
AMERIKA	181:	GGAAAACCTCCGGATTTGATAAATGAGGTTAGACCCAAATGTCCGATGTTCCAAACGCTA	240

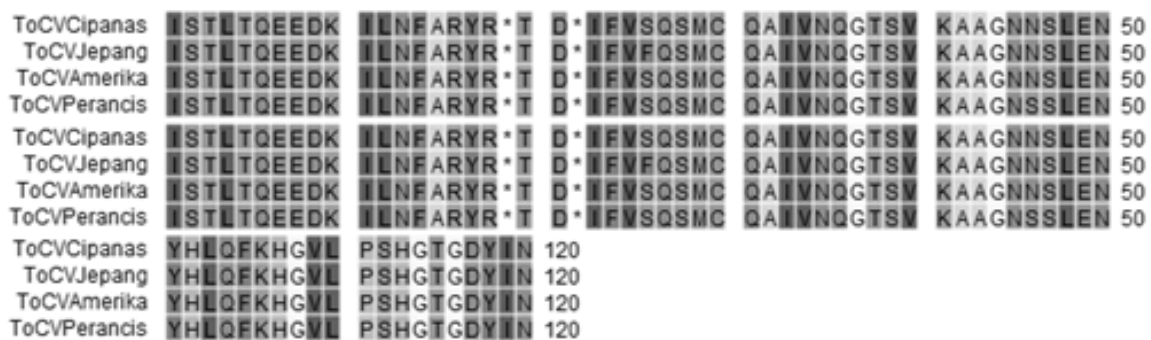
INDONESIA	241:	TACGTGGTACGCCAGAAGTCATGAAAAGATTATTCTTTATCCGGTCTTATTAAGCCTGAT	300
JEPANG	241:	TACGTGGTACGCCAGAAGTCATGAAAAGATTATTCTTTATCCGGTCTTATTAAGCCTGAT	300
PERANCIS	241:	TACGTGGTACGCCAGGAGTCATGAAAAGATTATTCTTTATCCGGTCTTATTAAGCCTGAT	300
AMERIKA	241:	TACGTGGTACGCCAGAAGTCATGAAAAGATTATTCTTTATCCGGTCTTATTAAGCCTGAT	300

INDONESIA	301:	TATCATTTACAATTCAAACATGGCGTATTACCAAGCCATGGTACCGGCGATTATATAAAT	360
JEPANG	301:	TATCATTTACAATTCAAACATGGCGTATTACCAAGCCATGGTACCGGCGATTATATAAAT	360
PERANCIS	301:	TATCATTTACAATTCAAACATGGCGTACTACCAAGCCATGGTACCGGCGATTATATAAAT	360
AMERIKA	301:	TATCATTTACAATTCAAACATGGCGTATTACCAAGCCATGGTACCGGCGATTATATAAAT	360

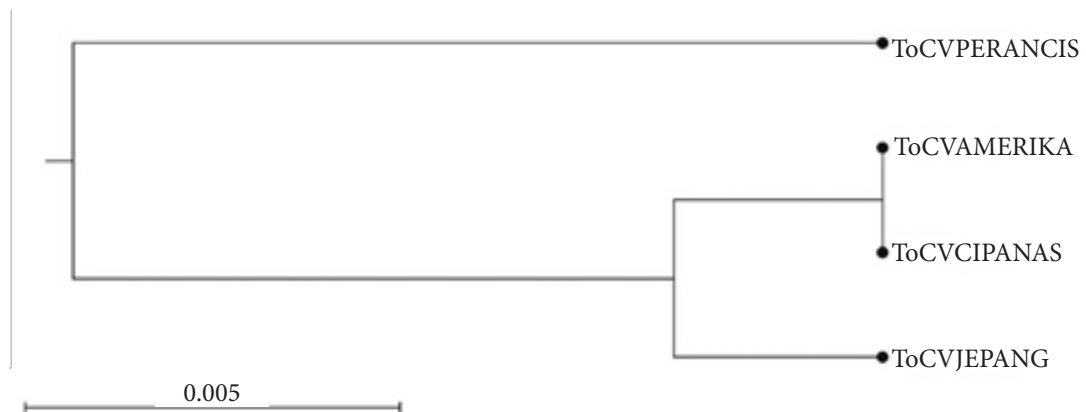
Gambar 5 Perbandingan sikuen nukleotida sebagian dari gen protein selubung ToCV asal Cipanas-Indonesia, Jepang, Perancis, dan Amerika menggunakan program BioEdit V.7.0.5

Tabel 2 Tingkat kesamaan sikuen nukleotida sebagian dari gen protein selubung ToCV asal Indonesia, Jepang, Perancis, dan Amerika

No akses	Asal isolat	Tingkat kesamaan (%)			
		Indonesia	Jepang	Perancis	Amerika
-	Indonesia	-	-	-	-
AB513443	Jepang	99	-	-	-
FM206382	Perancis	98	97	-	-
DQ234675	Amerika	100	99	98	-



Gambar 6 Penyejajaran asam amino ToCV isolat asal Cipanas dengan isolat asal Jepang, Amerika, dan Perancis menggunakan program CLC Seq Viewer V. 7.0.2.



Gambar 7 Pohon filogenetika berdasarkan sikuen nukleotida sebagian gen protein selubung isolat-isolat ToCV asal Cipanas-Indonesia, Jepang, Perancis, dan Amerika menggunakan program CLC Seq Viewer V.7.0.2.

Magelang, Jawa Tengah. Penyakit klorosis ini pada awalnya disebut sebagai penyakit ungu karena gejala lanjut pada daun menunjukkan warna merah kecokelatan hingga keunguan. Gejala klorosis juga ditemukan di sentra pertanaman tomat di Jawa Barat seperti di daerah Cipanas, Lembang, dan Garut (Suastika et al. 2010). Lebih lanjut pada penelitian ini infeksi TICV dan ToCV hanya berhasil dideteksi dari sampel tanaman tomat asal Cipanas.

Penelitian mengenai penularan dan kisaran inang TICV dan ToCV mengindikasikan

potensi kedua virus untuk menyebar luas dan cepat. Tanaman komoditas penting lain yang rentan terhadap TICV ialah kentang (*Solanum tuberosum*) dan lettuce (*Lactuca sativa*) (Li et al. 1998). Kisaran inang ToCV meliputi berbagai tanaman dari famili *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Apocynaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Plumbaginaceae*, dan *Solanaceae* (Wintermantel dan Wisler 2006). Li et al. (1998) juga melaporkan bahwa gulma *Chenopodium capitatum* dapat terinfeksi TICV, sedangkan

gulma *Physalis ixocarpa* dan *P. peruviana* dilaporkan merupakan inang ToCV (Trenado *et al.* 2007). Penularan kedua virus terjadi melalui serangga vektornya kutukebul (Hemiptera: Aleyrodidae). TICV ditularkan oleh *T. vaporariorum* (Duffus *et al.* 1996), sedangkan ToCV ditularkan oleh beberapa spesies kutukebul *B. tabaci*, *T. abutilonea*, dan *T. vaporarium* (Wisler *et al.* 1998b, Wintermantel dan Wisler 2006) walaupun *B. tabaci* merupakan vektor yang paling efisien.

Kedua virus yang dapat menyebabkan gejala klorosis pada tanaman tomat dapat dibedakan melalui metode deteksi molekular dan pengamatan gejala pada tanaman indikator *N. benthamiana* dan *N. clevelandii* (Wisler *et al.* 1998b). Metode RT-PCR menggunakan primer spesifik untuk TICV dan ToCV banyak digunakan untuk mendeteksi infeksi kedua virus pada tanaman tomat dengan gejala klorosis. Dovas *et al.* (2002) merancang pasangan *degenerate primer* HS-11/HS-12 yang dapat mendeteksi baik TICV maupun ToCV karena primer tersebut mengenali daerah dengan konservasi yang tinggi antara kedua virus, yaitu *heat shock protein 70*. DNA produk amplifikasi menggunakan pasangan primer HS-11/HS-12 selanjutnya digunakan untuk deteksi spesifik dengan metode *nested-PCR* menggunakan primer TIC-3/TIC4 dan ToC-5/ToC-6, berturut-turut untuk TICV dan ToCV. Dalmon *et al.* (2005) berhasil mendeteksi TICV dan ToCV pada tanaman tomat di Perancis menggunakan primer spesifik yang mengamplifikasi bagian gen protein selubung untuk TICV dan gen HSP70 untuk ToCV. Pasangan primer yang digunakan untuk mendeteksi kedua virus dari sampel tanaman tomat asal Jawa Barat dalam penelitian ini ialah ToCV-CF/ToCV-CR dan TICV-CF/TICV-CR seperti yang digunakan oleh Hirota *et al.* (2010) untuk mendeteksi TICV dan ToCV pada tanaman tomat di Jepang. Kedua pasang primer tersebut mengamplifikasi bagian gen protein selubung dengan tingkat konservasi yang tinggi.

Melalui metode RT-PCR dan analisis sikuen nukleotida dapat disimpulkan bahwa penyakit klorosis pada tanaman tomat di

Cipanas, Jawa Barat berasosiasi dengan infeksi TICV dan ToCV, seperti yang sudah dilaporkan terjadi di beberapa negara lainnya. Isolat TICV asal Indonesia (Cipanas) tersebut memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan TICV asal Jepang dan Spanyol, sedangkan isolat ToCV asal Cipanas memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan isolat ToCV asal Amerika.

DAFTAR PUSTAKA

- Dalmon A, Bouyer S, Cailly M, Girard M, Lecoq H, Desbiez C, Jacquemond M. 2005. First report of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in tomato crops in France. *Plant Dis.* 89(11):1243. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PD-89-1243C>.
- Dovas CI, Katis NI, Avgelis AD. 2002. Multiplex detection of crinivirus associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. *Plant Dis.* 86(12):1345–349. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.12.1345>.
- Duffus JE, Liu HY, Wisler GC. 1996. *Tomato infectious chlorosis virus*-a new clostero-like virus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *Eur J Plant Pathol.* 102:219–226. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01877960>.
- [EPPO] European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2005. *Tomato chlorosis crinivirus*. *Bull EPPO.* 35: 439–441. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2338.2005.00888.x>.
- Hartono S, Natsuki T, Sayama H, Atarashi H, Okuda S. 2003. Yellowing disease of tomatoes caused by *Tomato infectious chlorosis virus* newly recognized in Japan. *J Gen Plant Pathol.* 69: 61–64. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10327-002-0015-x>.
- Hartono S, Wijonarko A. 2007. Karakterisasi biologi molekuler *Tomato infectious chlorosis virus* penyebab penyakit kuning pada tanaman tomat di Indonesia. *Akta Agrosia.* 2:139–146.
- Hirota T, Natsuaki T, Murai T, Nishigawa H, Niibori K, Goto K, Hartono S, Suastika

- G, Okuda S. 2010. Yellowing disease of tomato caused by *Tomato chlorosis virus* newly recognized in Japan. *J Gen Plant Pathol.* 76:168–171. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10327-010-0219-4>.
- Li RH, Wisler GC, Liu HY, Duffus JE. 1998. Comparison of diagnostic techniques for detecting tomato infectious chlorosis virus. *Plant Dis.* 82(1):84–86. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.1.84>.
- Lozano G, Moriones E, Navas-Castillo J. 2006. Complete nucleotide sequence of the RNA2 of the *Crinivirus tomato chlorosis virus*. *Arch Virol.* 151:581–587. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-005-0690-y>.
- Suastika G, Hartono S, Nishigawa H, Natsuaki T. 2010. Yellowing disease outbreaks in tomato in Indonesia associated with infection of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus*. Di dalam: *Abstract ISSAAS International Congress 2010: Agricultural Adaptation in Response to Climate Change*; 4-8 Nov 2010; Sanur, Bali, Indonesia. Sanur: ISSAAS.
- Trenado HP, Fortes IM, Louro D, Navas-Castillo J. 2007. *Physalis ixocarpa* and *P. peruviana*, new natural hosts of *Tomato chlorosis virus*. *Eur J Plant Pathol.* 118:193–196. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-007-9129-5>.
- Tsai WS, Shih SL, Green SK, Hanson P. 2004. First report of the occurrence of *Tomato infectious chlorosis virus* in Taiwan. *Plant Dis.* 88:311. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.3.311B>.
- Wintermantel WM, Wisler GC. 2006. Vector specificity, host range, and genetic diversity of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Dis.* 90:814–819. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PD-90-0814>.
- Wisler GC, Duffus JE, Liu HY, Li RH. 1998a. Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses. *Plant Dis.* 82(3):270–280. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.3.270>.
- Wisler GC, Li RH, Liu HY, Lowry DS, Duffus JE. 1998b. Tomato chlorosis virus: a new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. *Phytopathol.* 88:402–409. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PHTO.1998.88.5.402>.