

## KOMUNIKASI SINGKAT

### Identifikasi Molekuler *Tobacco mosaic virus* pada Anggrek di Sleman, Yogyakarta

### Molecular Identification of *Tobacco mosaic virus* on Orchid Plants In Sleman, Yogyakarta

Soesanto Somowiyarjo, Sedyo Hartono\*, Sri Sulandari, Sekar Utami Putri  
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281

#### ABSTRAK

*Tobamovirus* merupakan kelompok virus yang memiliki kisaran inang luas, termasuk tanaman anggrek yang mempunyai nilai ekonomi tinggi. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi virus dari kelompok *Tobamovirus* yang menginfeksi anggrek. Isolat virus diambil dari kebun anggrek petani di Sleman, Yogyakarta. Cairan perasan tanaman dari daun anggrek yang bergejala flek nekrosis diinokulasikan pada tanaman indikator *Chenopodium amaranticolor*. Gejala bercak lokal klorosis pada daun muncul 3 hari setelah inokulasi. Total RNA tanaman diekstraksi dari daun *C. amaranticolor* bergejala menggunakan kit komersial dan cDNA disintesis dari RNA total menggunakan primer oligo d(T). Amplifikasi cDNA menggunakan primer spesifik gen *movement protein* TMV-1F dan TMV-2R berhasil mendapatkan amplicon berukuran  $\pm 422$  pb. Runutan nukleotida amplicon tersebut memiliki homologi 98% dengan *Tobacco mosaic virus* isolat Yongren-2 dari Cina.

Kata kunci: *Chenopodium amaranticolor*, *polymerase chain reaction*, *Tobamovirus*

#### ABSTRACT

*Tobamovirus* is a group of virus with a wide host range, including orchid plant which considered as an economically important plant. This research aimed to identify *Tobamovirus* infecting orchids. Virus isolates were collected from orchid nursery in Sleman, Yogyakarta. Plant extract from orchid showing necrotic flex symptom was inoculated to indicator plants *Chenopodium amaranticolor*. Chlorotic local lesion symptoms occurred within 3 days after inoculation. RNA total from symptomatic *C. amaranticolor* was extracted by using a commercial kit. cDNA was synthesized using oligo d(T) primer. Amplification of cDNA using partial movement protein specific primers TMV-1F and TMV-2R was successfully amplified the amplicon with size  $\pm 422$  bp. The nucleotide sequences of this amplicon showed highest DNA homology (98%) with *Tobacco mosaic virus* Yongren-2 isolat from China.

Key words: *Chenopodium amaranticolor*, *polymerase chain reaction*, *Tobamovirus*

\*Alamat penulis korespondensi: Jurusan Hama Penyakit Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada. Jalan Flora 1 Bulaksumur Yogyakarta 55281  
Tel: 0274-523926, Faks: 0274-523926, Surel: sedyo\_h@yahoo.com

Anggrek adalah salah satu tanaman hias yang bernilai ekonomi tinggi, namun budi daya anggrek di Indonesia masih menemui berbagai kendala antara lain infeksi patogen seperti virus. Virus-virus seperti *Orchid fleck virus*, *Cucumber mosaic virus*, *Bean yellow mosaic virus*, dan kelompok *Potyvirus* dapat menginfeksi anggrek, namun dengan persentase relatif rendah dibandingkan dengan *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) dan *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) (Khentry *et al.* 2006; Zheng *et al.* 2008; Urban dan Fajerka 2008). Gejala infeksi ganda CymMV dan ORSV pada daun anggrek dari kelompok *Encyclia*, *Oncidium*, *Shomburghia*, *Brassia*, *Guarianthe*, *Cattleya*, *Epidendrum*, *Vanilla*, *Xilobium*, *Laelia*, dan *Brassocattleya* berupa bercak kuning, ada garis atau semburat kuning, klorosis dan bercak hitam nekrosis telah dilaporkan terjadi di Meksiko (Valadares dan Almaraz 2012).

Pada awal tahun 2015 di pertanaman anggrek milik petani dusun Kentungan, Desa Condongcatur, Kecamatan Depok, Kabupaten Sleman, Yogyakarta ditemukan adanya gejala flek nekrosis cokelat kehitaman pada daun anggrek *Cattleya* (*Cattleya* sp.) dengan intensitas penyakit antara 20–80%. Gejala penyakit ini, pada mulanya oleh petani, diduga disebabkan oleh cendawan. Berdasarkan pada pengamatan perkembangan gejala di lapangan, gejala penyakit ini hampir sama dengan infeksi CymMV atau ORSV, dan *Tobacco mosaic virus* strain Orchid (TMV-O). Kedua

virus tersebut merupakan patogen utama pada anggrek (Muharam *et al.* 2013).

Gejala pada daun muda berupa bintik hitam kecil seperti nekrosis lokal (Gambar 1a) yang berkembang menjadi flek nekrosis yang merata di permukaan daun (Gambar 1b). Gejala ini mirip dengan gejala yang disebabkan oleh ORSV (TMV-O). Penelitian sebelumnya melaporkan adanya infeksi ganda penyakit anggrek yang disebabkan oleh TMV-O dan CymMV dengan intensitas penyakit berturut-turut 61.63 dan 52% (Muharam *et al.* 2013). Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi virus penyebab gejala flek nekrosis cokelat kehitaman yang menginfeksi anggrek.

Sampel daun anggrek (*Cattleya* sp.) bergejala flek nekrosis diambil dan ditularkan secara mekanis ke tanaman *C. amaranticolor* mengikuti metode inokulasi mekanis yang dilakukan oleh Kurnianingsih dan Damayanti (2012).

Ekstraksi RNA total dilakukan dari 0.1 g sampel daun sakit menggunakan kit komersial Geneaid. RNA total selanjutnya digunakan sebagai cetakan untuk sintesis cDNA. Sintesis cDNA menggunakan total volume 12.5  $\mu$ L dengan protokol sesuai pabrikan (AMV Promega). Tahapan sintesis cDNA dilakukan dengan komposisi pereaksi terdiri atas 1  $\mu$ L RNA, 0.5  $\mu$ L 10 mM primer d(T) dan 3.5  $\mu$ L air bebas nuklease, dicampur hingga homogen, kemudian diinkubasikan pada suhu 70  $^{\circ}$ C selama 5 menit. Larutan tersebut didinginkan selama 5 menit, selanjutnya digoyang supaya



Gambar 1 Gejala *Tobacco mosaic virus* pada anggrek dan *Chenopodium amaranticolor*. a, Gejala nekrosis pada daun anggrek muda; b, Flek nekrosis pada daun anggrek dewasa; c, Bercak lokal klorosis pada daun *C. amaranticolor*. Gejala ditunjukkan dengan tanda panah merah.

larutan mengumpul di dasar. Larutan ditambahi 2.5  $\mu$ L 5 $\times$  bufer reaksi transkrip balik, 1.25  $\mu$ L 10 mM dNTP, 0.5  $\mu$ L RNasin<sup>®</sup>Ribonuklease inhibitor, 2.5  $\mu$ L natrium pyrophosphate, 0.75  $\mu$ L AMV RT dan diinkubasi pada suhu 42 °C selama 60 menit.

RT-PCR dilakukan menggunakan Kappa *Taq polymerase* dengan komposisi premix PCR sesuai yang dianjurkan pembuat enzim (Geneaid) menggunakan primer spesifik gen internal *movement protein* (MP) TMV-1F (5'-GACCTGACAAAAATGGAG AAGATCT-3') dan TMV-2 (5'-GAAAGCGG ACAGAAACCCGCTG-3') dengan ukuran ampikon  $\pm$  422 pb. Amplifikasi dilakukan dengan program pra-denaturasi pada suhu 94 °C selama 5 menit dilanjutkan dengan 35 siklus denaturasi pada suhu 94 °C selama 30 detik, aneling pada suhu 62 °C selama 45 detik, ekstensi pada suhu 72 °C selama 1 menit dan ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 5 menit dan penyelesaian pada suhu 4 °C selama 10 menit (Da Silva *et al.* 2008).

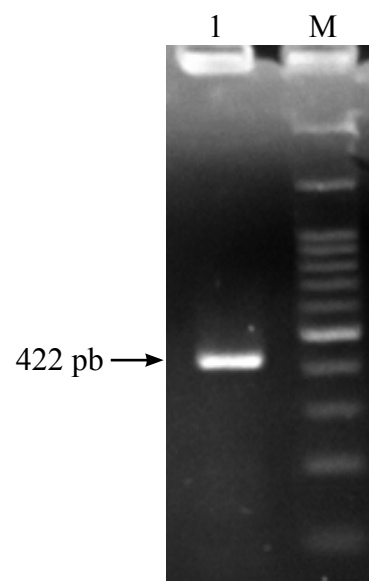
Pita DNA target yang diperoleh kemudian dikirimkan ke First Base Malaysia untuk perunut nukleotidanya. Sikuen nukleotida yang didapatkan dianalisis terhadap nukleotida yang terdeposit pada GenBank menggunakan perangkat lunak Clustal W Bioedit.

Penularan secara mekanis pada tanaman indikator *C. amaranticolor* menunjukkan gejala bercak lokal klorosis pada hari ke-3 setelah inokulasi (Gambar 1c). Kemunculan gejala yang cepat mengindikasikan sifat virus dari kelompok *Tobamovirus*.

RT-PCR menggunakan primer spesifik TMV-1F/TMV-2R berhasil mengamplifikasi DNA target dengan ukuran  $\pm$  422 pb (Gambar 2). Perunut nukleotida dari hasil PCR ini menunjukkan adanya hubungan homologi DNA tertinggi (98%) dengan TMV isolat Yongren-2 dari Cina (Tabel 1) yang menginfeksi tembakau. Sebelumnya TMV dilaporkan menyebabkan gejala yang ringan pada tembakau dan pada isolat TMV ini ditemukan 55 nt yang berbeda pada ORF 126/183-kDa dan 30-kDa (Holt *et al.* 1990). Namun, infeksi TMV pada anggrek *Cattleya* dalam penelitian ini menyebabkan

gejala flek nekrosis cokelat kehitaman. Hal ini menunjukkan virus yang sama dapat menyebabkan gejala yang berbeda pada inang yang berbeda. Perlu dirunut lebih lanjut ORF 126/183-kDa dan 30-kDa TMV pada anggrek ini yang mungkin berperan menyebabkan perbedaan gejala ini.

*Tobamovirus* yang menginfeksi anggrek adalah TMV-O (ORSV) dengan ukuran panjang partikel 18-300 nm (Navalinskiene *et al.* 2005). ORSV sebelumnya telah dilaporkan menginfeksi anggrek *Dendrobium* di Gunung Sindur, Bogor dengan gejala nekrosis cokelat pada bagian bawah daun (Lakani *et al.* 2010), dan TMV-O dilaporkan menginfeksi pada anggrek komersial di Jawa dan Bali (Muharam *et al.* 2013). TMV pada anggrek di Sleman ini berbeda dengan TMV-O (ORSV) dilihat dari homologi nukleotidanya hanya 75% (Tabel 1). TMV pada anggrek di Sleman ini kemungkinan masuk ke Indonesia melalui bibit anggrek impor. Deteksi dini merupakan salah satu cara mencegah masuknya bibit anggrek yang membawa virus (Zetler *et al.* 1990). Sanitasi disertai dengan disinfeksi alat dan tangan pekerja perlu dilakukan untuk mencegah penularan di lapangan (Khentry *et al.* 2006).



Gambar 2 Visualisasi fragmen DNA hasil RT-PCR TMV dari sampel daun anggrek bergejala di Sleman, Yogyakarta. 1, sampel; M, penanda DNA 100 pb (Geneaid).

Tabel 1 Homologi sikuen nukleotida TMV yang menginfeksi tanaman anggrek di Sleman, Yogyakarta dengan beberapa sikuen anggota *Tobamovirus* yang tersedia di GenBank

Isolat virus <sup>a</sup>	Homologi							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1. TMV	ID							
2. ORSV	77	ID						
3. ORSV	75	98	ID					
4. ORSV	76	98	99	ID				
5. ReMV	83	68	68	68	ID			
6. TMV	98	76	75	76	83	ID		
7. TMV	97	77	76	77	83	98	ID	
8. TMV	97	69	69	69	81	98	98	ID

<sup>a</sup>Isolat 2, ORSV USA (NC001728); Isolat 3, ORSV AUS (KF855954); Isolat 4, ORSV USA (AF033848); Isolat 5, ReMV (*Rehmannia Mosaic Virus*) Jepang (AB628188); isolat 6, TMV Cina\_Yongren-2 (HE818458); Isolat 7, TMV Cina\_Fumeng (HE818416) dan; Isolat 8, TMV USA (AF273221).

Berdasarkan hasil deteksi dan analisis runutan DNA gen *movement* protein, dapat disimpulkan bahwa daun anggrek yang bergejala flek nekrosis yang merata pada permukaan daun anggrek di Sleman, Yogyakarta berasosiasi dengan infeksi *Tobacco mosaic virus* dengan homologi tertinggi dengan TMV isolat Yongren-2 dari Cina.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini sebagian didanai oleh Proyek Hibah Penelitian Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada Tahun Anggaran 2015.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Da Silva RM, de Soutol ER, Pedrosol JC, Arakava R, Almeida AMR, Barbozal AAL, Vidal JB. 2008. Detection and identification of TMV infecting tomato under protected cultivation in Parana State. *Braz Arch Biol Technol.* 51(5):903–909. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132008000500005>.
- Holt CA, Hodgson RA, Nelson RS. 1990. Characterization of the masked strain of *tobacco mosaic virus*: identification of the region responsible for symptom attenuation by analysis of an infectious cDNA clone. *Mol Plant Interact.* 3(6):417–423. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-3-417>.
- Khentry Y, Paradornuwat A, Tantiwiwat S, Phansir, Thavecaai N. 2006. Incidence of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in *Dendrobium* spp. in Thailand. *Crop Prot.* 25(9):926–932. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2005.12.002>.
- Kurnianingsih L, Damayanti TA. 2012. Lima ekstrak tumbuhan untuk menekan infeksi *Bean common mosaic virus* pada tanaman kacang panjang. *J Fitopatol Indones.* 8(6):155–160.
- Lakani I, Suastika G, Mattjik N, Damayanti TA. 2010. Identification and molecular characterization of *Odontoglossum Ringspot Virus* (ORSV) from Bogor, Indonesia. *J Hayati BioSci.* 17(2):101–104. DOI: <http://dx.doi.org/10.4308/hjb.17.2.101>.
- Muharam A, Sulyo Y, Rahardjo IB, Diningsih E, Suryanah. 2013. Studi penyebaran *Tobacco Mosaic Virus* Strain *Orchid* dan *Cymbidium Mosaic Virus* dengan metode DAS ELISA pada tanaman anggrek komersial di Pulau Jawa dan Bali serta teknologi pembebasannya. *J Hort.* 23(1):56–64.
- Navalinskiene M, Raugalas J, Samuitiene M. 2005. Viral diseases of flower plants: 16 identification of viruses affecting orchids (*Cymbidium* Sw.). *Biologija.* 2:29–34.
- Urban TC, Fajerka EH. 2008. The morphogenetic capability and the viability

- of regenerants in micropropagated orchids hybrids infected with viral pathogens. *Folia Hort.* 20(2):93–102. DOI: <http://dx.doi.org/10.2478/fhort-2013-0118>.
- Valadares AGS, Almaraz RDLT. 2012. First Report of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in orchids in Mexico. *Plant Dis.* 96(3):464. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-08-11-0655>.
- Zettler FW, Ko Nj, Wisler GC, Elliot MS, Wong SM. 1990. Viruses of orchids and their controls. *Plant Dis.* 74 (9):621–626. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PD-74-0621>.
- Zheng YX, Chen CC, Chen YK, Jan FJ. 2008. Identification and characterization of *Potyvirus* causing chlorotic spots on *Phalaenopsis* orchids. *Eur J Plant Pathol.* 121:87–95. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-008-9281-6>.