

Identitas dan Keragaman Genetik Begomovirus yang Berasosiasi dengan Penyakit Keriting pada Tomat Berdasarkan Teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*

Tri J. Santoso¹, Sri H. Hidayat², M. Herman¹, H. Aswidinnoor³, dan Sudarsono³

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

²Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

³Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

ABSTRACT

Identities and Genetic Diversities of Begomoviruses Associated with Leaf Curl Disease of Tomato Based on the Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Technique. *Tri J. Santoso, Sri H. Hidayat, M. Herman, H. Aswidinnoor, and Sudarsono.* Begomoviruses, members of the Geminivirus, are considered as emerging plant viruses. This was due to the increasing incidences and severities of the diseases in a number of economically important crops, including tomato. Genetic diversities of the Begomovirus isolates infecting tomato (*Lycopersicon esculentum*) of several areas in Indonesia were analyzed by using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) technique. A 1500 base pairs of PCR fragments amplified by using degenerate primers for Begomovirus was digested using four restriction enzymes, i.e., *DraI*, *EcoRI*, *RsaI*, and *PstI*. The pattern of RE digested fragments of 8 Begomovirus isolates and the predicted RFLP fragments of the Begomovirus isolates in the GeneBank database were used to determine the genetic identities and diversities among the isolates. Positive results of the PCR amplifications proved that diseased tomato plant samples collected from 8 locations in Java and Sumatra were infected with at least one Begomovirus isolate. The PCR amplification products, which were digested using the four restriction enzymes indicated the presence of polymorphisms among the DNA fragments of the Begomovirus isolates. Identifications of the Begomovirus indicated that the Brastagi, Bogor, Sragen, Ketep, and Boyolali isolates were *Tomato Leaf Curl Virus* (ToLCV); the isolates from Malang and Blitar isolates were *Ageratum Yellow Vein Virus* (AYVV), while one isolate from Kaliurang was *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV). Results of the phylogenetic analysis of the 8 Begomovirus isolates based on Begomoviruses from the DNA database indicated that they belonged to three different groups.

Key words: Begomovirus, tomato leaf curl, genetic diversity, PCR-RFLP technique.

PENDAHULUAN

Dalam dasawarsa terakhir ini di berbagai daerah di Indonesia dilaporkan muncul serangan penyakit keriting daun pada tanaman tomat dan cabai. Hasil penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa penyakit tersebut disebabkan oleh infeksi Begomovirus dari kelompok geminivirus dan famili *Geminiviridae* (Aidawati *et al.* 2005, Hidayat *et al.* 1999). Penurunan hasil akibat serangan penyakit keriting daun pada tanaman di daerah Bogor, Jawa Barat dan sekitarnya dilaporkan dapat mencapai 50-70% (Sudiono *et al.* 2001). Di Indonesia, kejadian penyakit keriting akibat infeksi Begomovirus pada pertanaman tomat dapat mencapai 90-100%. Infeksi penyakit keriting daun ini dilaporkan dapat menyebabkan penurunan hasil hingga 50-100% (AVRDC Centerpoint Newsletter-spring 2003 issue) dibandingkan dengan tanaman tomat sehat. Selain tanaman tomat, Begomovirus juga menginfeksi beberapa tanaman lain, seperti kacang-kacangan, mentimun, cabai, dan ubi kayu baik di daerah tropis maupun subtropis (Polkela *et al.* 2005, Rodriguez *et al.* 2006).

Pada berbagai tanaman, infeksi virus dapat menyebabkan munculnya gejala fisiologis yang sama dengan kekurangan unsur hara tertentu (Agrios 1997). Selain itu, keakuratan identifikasi patogen yang menyerang merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap keberhasilan pengendalian penyakit pada tanaman (Agrios 1997). Dengan demikian, tersedianya metode deteksi patogen yang menyerang tanaman perlu dikembangkan.

Deteksi dan identifikasi Begomovirus yang menyerang tanaman dapat dilakukan antara lain dengan pengamatan gejala yang muncul pada tanaman terinfeksi, penggunaan teknik serologi dan *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) untuk berbagai gen pada genom virusnya. Jika hanya berdasarkan gejala atau teknik serologi, kesalahan deteksi Begomovirus yang menginfeksi tanaman dapat terjadi karena adanya

kesamaan gejala infeksi dengan gejala kekurangan hara dan rendahnya titer dari antigen dalam jaringan tanaman (Agrios 1997). Teknik PCR-RFLP dilaporkan lebih sensitif dan telah berhasil digunakan untuk mengidentifikasi Begomovirus yang berasosiasi dengan penyakit keriting daun yang menyerang tanaman tomat dan cabai (Aidawati *et al.* 2005).

Penggunaan teknik PCR untuk mendeteksi dan mengidentifikasi Begomovirus mempunyai keuntungan antara lain hanya membutuhkan sedikit contoh DNA dan jaringan tanaman yang diduga terserang. Selain itu, penggabungan teknik PCR dengan RFLP juga dapat digunakan untuk melakukan analisis keragaman genetik spesies Begomovirus yang menginfeksi tanaman (Aidawati *et al.* 2005, Rojas *et al.* 1993). Informasi tentang identitas dan keragaman Begomovirus yang menginfeksi pertanaman tomat di berbagai lokasi di Indonesia akan sangat bermanfaat dalam usaha pengembangan metode pengendaliannya.

Tujuan jangka panjang penelitian yang dilakukan adalah untuk mempelajari keragaman genetik Begomovirus yang menyerang pertanaman tomat di Indonesia, secara lebih detail meliputi (1) mengamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan templat total DNA tanaman sakit dan primer spesifik untuk genom Begomovirus, (2) menentukan identitas virus berdasarkan pola pita hasil restriksi produk PCR-RFLP, dan (3) menganalisis keragaman isolat Begomovirus yang menginfeksi contoh tanaman tomat sakit dari 8 sentra produksi tomat di Jawa dan Sumatera.

BAHAN DAN METODE

Contoh Tanaman Sakit

Contoh tanaman tomat dengan gejala spesifik yang diduga akibat terinfeksi Begomovirus dikumpulkan dari 8 sentra produksi tomat di Pulau Jawa dan Sumatera digunakan sebagai bahan penelitian. Contoh tanaman sakit diambil dari daerah Malang dan Blitar (Provinsi Jawa Timur), Sragen, Boyolali, dan Magelang (Provinsi Jawa Tengah), Kaliurang (Daerah Istimewa Yogyakarta), Bogor (Provinsi Jawa Barat), dan Medan (Provinsi Sumatera Utara). Pengumpulan contoh tanaman tomat sakit telah dilakukan dalam percobaan sebelumnya (Aidawati *et al.* 2005, Santoso *et al.* 2007). Total DNA yang diisolasi dari contoh tanaman sakit digunakan untuk amplifikasi sebagian genom Begomovirus dengan menggunakan teknik PCR.

Isolasi Total DNA dari Tanaman Sakit

Ekstraksi total DNA dari contoh tanaman sakit dilakukan dengan menggunakan metode CTAB (Doyle

dan Doyle 1990) dengan penambahan 2% *Polyvinil Pyrrolidone* (PVP) ke dalam larutan penyangga yang digunakan untuk ekstraksi. Daun tanaman seberat 2 g dibekukan dengan nitrogen cair dan digerus menggunakan mortar dan pestle hingga hancur. Gerusan daun dimasukkan ke dalam tabung mikro (2,0 ml), ke dalamnya ditambahkan larutan pengekstrak (EDTA-20 mM, Tris-HCl, pH 8-100 mM, NaCl-1,4 M, CTAB-2%, PVP-2%, dan Mercap-toethanol-0,2%) sebanyak 700 µl dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit. Campuran dibolak-balik setiap 10 menit agar homogen.

Total DNA dipisahkan dari bagian-bagian sel lainnya dengan menambahkan larutan phenol : chloroform : isoamilalkohol (25 : 24 : 1 v/v/v) sebanyak 700 µl, tabung dibolak-balik selama 5 menit, dan campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipisahkan dari bagian sel lainnya dan dipindahkan ke tabung mikro 1,5 ml. Untuk mengendapkan total DNA, ke dalam tabung ditambahkan natrium asetat (1/10x volume supernatan) dan isopropanol dingin (0,7x volume supernatan), tabung dibolak-balik perlahan-lahan dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Setelah supernatan dibuang, endapan total DNA yang diperoleh dicuci dengan etanol 70% dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Setelah dikeringkan, endapan DNA dilarutkan dengan larutan penyangga TE (1x) dan disimpan sebagai stok DNA. Stok DNA disimpan dalam *freezer* bersuhu -80°C dan siap digunakan sebagai templat (cetakan) dalam proses PCR.

Amplifikasi Genom dengan Teknik PCR

Amplifikasi sebagian dari genom Begomovirus dilakukan dengan teknik PCR mengikuti prosedur yang dikembangkan oleh Rojas *et al.* (1993). Amplifikasi sebagian dari genom dilakukan dengan menggunakan primer *degenerate* spesifik untuk geminivirus (PAL1v1978-F dan PAR1c715-R) yang dikembangkan oleh Rojas *et al.* (1993). Runutan nukleotida untuk primer PAL1v1978-F adalah 5'-GCATCTGCAGGCCAC ATYGTCTTYCCNGT-3' sedangkan untuk primer PAR1c715-R adalah 5'-GATTTCTGCAGTTDATRTTYTCR TCCATCCA-3'. Pasangan primer yang digunakan mengamplifikasi sebagian genom geminivirus (Begomovirus) yang terdiri atas bagian gen *replicase*, daerah intergenik dan gen protein selubung dengan panjang produk amplifikasi sebesar 1.500 pasang basa.

Komponen reagen untuk amplifikasi PCR terdiri atas stok total DNA sebagai templat 2-5 µl, dNTPs dengan konsentrasi 10 µM-0,625 µl, primer PAL1v1978-F dan PAR1c715-R masing-masing 5 µM-1 µl, MgCl₂ 50 µM-0,75 µl, enzim *Taq* DNA *polymerase* 5 unit/µl 0,2 µl

dan larutan penyangga PCR 10x-2,5 μ l. Amplifikasi PCR dilakukan menggunakan tabung PCR dengan volume 0,2 ml. Reaksi amplifikasi dilakukan dengan mesin PCR (MJ Research tipe PCT-100). Pemrograman reaksi amplifikasi dilakukan sebagai berikut: satu siklus denaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit, diikuti dengan 30 siklus yang terdiri atas tahapan denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, penempelan primer (*primer annealing*) pada suhu 55°C selama 1 menit, pemanjangan primer (*primer extension*) pada 72°C selama 3 menit dan diakhiri dengan satu siklus reaksi pemanjangan primer pada suhu 72°C selama 3 menit. Dalam penelitian yang dilakukan hanya dianalisis satu produk amplifikasi dari masing-masing lokasi tempat contoh tanaman sakit dikumpulkan.

Fragmen DNA hasil amplifikasi dievaluasi dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Elektroforesis gel agarosa (1%) dilakukan dengan menggunakan larutan penyangga tris-boric acid EDTA (TBE 0,5x), voltase 90 volt, dan selama 45 menit. Ukuran produk amplifikasi PCR ditentukan dengan pembandingan menggunakan DNA standar (100 bp *ladder* dari Invitrogen). Setelah pewarnaan dengan menggunakan larutan etidium bromida (10 mg/l) selama 10 menit, hasil elektroforesis dibilas dengan air destilata selama 20-30 menit dan divisualisasi menggunakan perangkat *Chemidoc gel system* (Biorad). Jika dari amplifikasi PCR berhasil diperoleh potongan DNA dengan ukuran 1.500 pasang basa, maka hal ini mengindikasikan keberadaan Begomovirus dalam contoh tanaman tomat sakit yang dianalisis.

Analisis Produk PCR dengan RFLP

Masing-masing produk PCR yang didapat dipotong dengan menggunakan enzim restriksi *DraI* (TTT↓AAA), *EcoRI* (G↓AATTC), *RsaI* (GT↓AC) dan *PstI* (CTGCA↓G). Berdasarkan runutan nukleotida dari berbagai isolat Begomovirus yang tersimpan di dalam DNA database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), empat enzim restriksi yang dipilih tersebut mampu memotong potongan genom Begomovirus yang diamplifikasi menggunakan pasangan primer PAL1v1978-F dan PAR1c715-R.

Pemotongan masing-masing hasil amplifikasi PCR dengan menggunakan empat enzim restriksi terpilih dilakukan mengikuti prosedur yang disarankan oleh produsen enzim restriksi (Invitrogen). Campuran reaksi restriksi terdiri atas produk PCR 10 μ l, masing-masing enzim restriksi 10 unit, larutan penyangga yang sesuai untuk masing-masing enzim restriksi 1,5 μ l dan ditambahkan *double distilled water* sehingga mencapai total volume 15 μ l. Campuran reaksi diinkubasi pa-

da suhu 37°C selama 12 jam. Berbagai ukuran potongan DNA hasil restriksi dipisahkan berdasarkan ukurannya (difragmentasi) dengan elektroforesis gel agarosa (1,5%) menggunakan prosedur sebagaimana telah dijelaskan sebelumnya. Visualisasi hasil fragmentasi potongan DNA dilakukan menggunakan *Chemidoc gel system* (Biorad).

Keragaman Genetik Begomovirus Berdasarkan PCR-RFLP

Polimorfisme ukuran DNA hasil amplifikasi setelah dipotong dengan enzim restriksi (PCR-RFLP) digunakan sebagai dasar untuk menentukan identitas dan keragaman Begomovirus yang ada pada contoh tanaman tomat sakit dari 8 lokasi di Indonesia. Prediksi RFLP berdasarkan data runutan nukleotida untuk berbagai Begomovirus yang tersimpan di DNA database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) digunakan sebagai pembandingan. Pengelompokan (*clustering*) antar Begomovirus dari 8 lokasi di Indonesia dan dengan Begomovirus yang data runutan nukleotidanya tersimpan dalam DNA database dilakukan dengan *unweighted pair group method with arithmetic mean* (UPGMA) menggunakan perangkat lunak komputer NTSys versi 2.1.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Beberapa contoh tanaman sakit yang ditemukan di lapang dengan gejala spesifik yang diduga akibat terinfeksi Begomovirus ditunjukkan pada Gambar 1. Gejala umum tanaman tomat yang terinfeksi Begomovirus adalah tanaman kerdil dengan arah cabang dan tangkai daun cenderung tegak. Anak daun kecil-kecil, mengkerut, dan sering memperlihatkan cekungan pada pinggir daun (daun keriting) dengan atau tanpa warna kuning. Bunga dan buah sering tidak terbentuk, walaupun terbentuk buahnya jarang dan ukurannya kecil (Green dan Kaloo 1994).

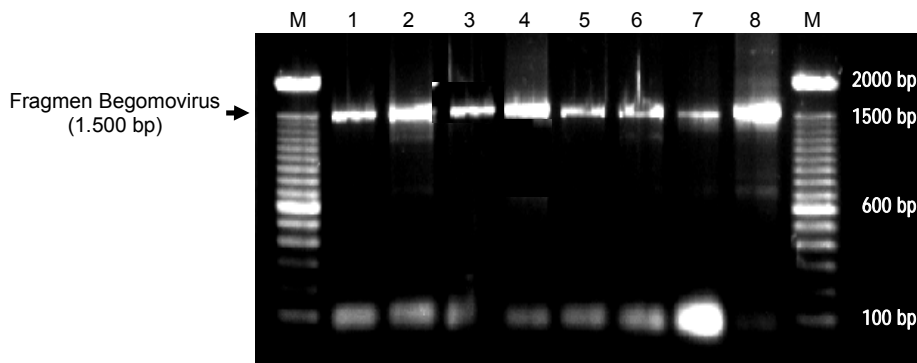
Amplifikasi Genom dengan Teknik PCR

Hasil amplifikasi PCR DNA genom 8 isolat Begomovirus menggunakan primer *degenerate* spesifik ditampilkan pada Gambar 2. Dari 8 isolat Begomovirus yang diidentifikasi, semuanya menunjukkan adanya fragmen hasil amplifikasi yang diindikasikan dengan terbentuknya amplicon berukuran sekitar 1.500 bp.

Begomovirus merupakan virus yang sangat mudah dideteksi dan diidentifikasi baik dengan mengamati gejala spesifik atau menggunakan teknik PCR. Kelompok virus ini mempunyai beberapa gejala spesifik ketika menginfeksi tanaman tomat, di antaranya adalah daun menggulung (daun keriting) dan berukuran



Gambar 1. Tanaman tomat yang diduga terinfeksi Begomovirus di lapang.



Gambar 2. Hasil amplifikasi PCR DNA Begomovirus asal tanaman tomat dari 8 daerah yang berbeda menggunakan primer universal. M = 100 bp, 1 = Brastagi, Medan (Sumatera Utara), 2 = Bogor (Jawa Barat), 3 = Sragen (Jawa Tengah), 4 = Malang (Jawa Timur), 5 = Blitar (Jawa Tengah), 6 = Magelang (Jawa Tengah), 7 = Kaliurang (DI Yogyakarta), 8 = Boyolali (Jawa Tengah).

an kecil-kecil (Gambar 1). Deteksi dengan PCR mudah dilakukan karena virus ini melakukan replikasi menggunakan sebuah DNA intermediet yang berbentuk sirkuler dan utas ganda (bentuk replikatif) yang dapat bertindak sebagai sebuah cetakan untuk amplifikasi PCR. Berdasarkan gejala-gejala yang dapat diamati di lapang (Gambar 1) dan hasil amplifikasi PCR (Gambar 2) dapat diindikasikan adanya insiden yang tinggi dari penyakit keriting daun yang disebabkan oleh infeksi Begomovirus pada tanaman tomat di beberapa daerah sentra produksi tomat.

Analisis Produk PCR dengan RFLP

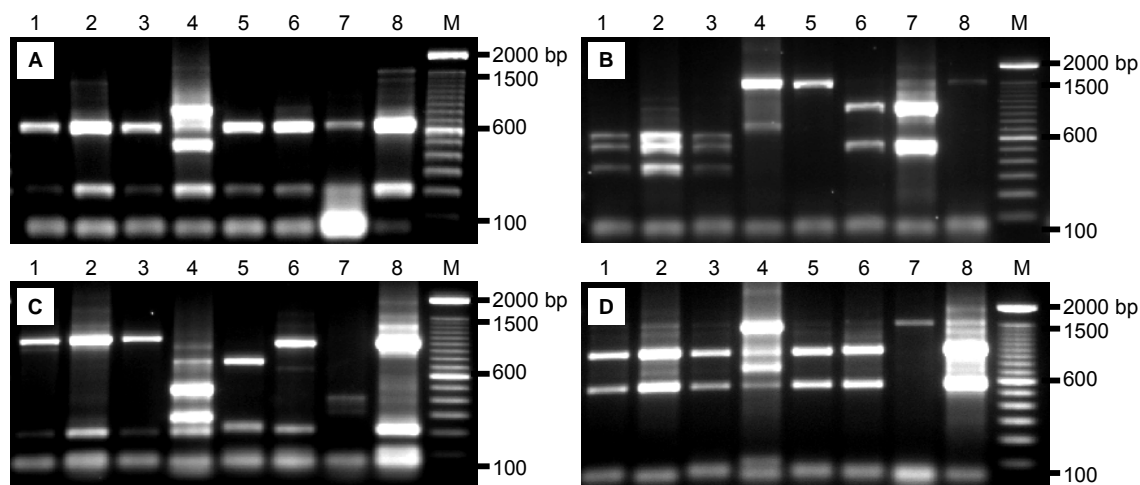
Amplikon DNA yang dihasilkan (1.500 bp) dipotong dengan empat macam enzim restriksi (*DraI*, *EcoRI*, *RsaI*, dan *PstI*) untuk melihat adanya perbedaan situs enzim restriksi. Hasil pemotongan fragmen DNA Begomovirus dari sampel tanaman tomat asal 8 daerah yang berbeda dengan empat macam enzim restriksi ditampilkan pada Gambar 3. Hasil pemotongan fragmen DNA Begomovirus menggunakan empat macam enzim restriksi menunjukkan adanya polimorfisme fragmen DNA dari isolat-isolat Begomovirus yang

dianalisis. Situs enzim restriksi yang dimiliki oleh amplikon geminivirus bervariasi antara 0-3 situs. Isolat Begomovirus dari Malang dan Blitar tidak memiliki situs enzim restriksi *EcoRI* (Gambar 3B), sedangkan isolat Kaliurang (DIY) tidak memiliki situs enzim *EcoRI* dan *PstI* (Gambar 3B dan 3D). Pita DNA yang muncul berukuran 700 bp pada sampel Malang (No. 4, Gambar 3B) diduga hanya merupakan *artifact* (produk PCR non spesifik). Jumlah situs restriksi terbanyak dimiliki oleh isolat Malang ketika dipotong dengan enzim *RsaI* (Gambar 3C). Perbedaan jumlah situs restriksi ini mengindikasikan adanya variasi genetik di antara 8 isolat Begomovirus yang dipelajari.

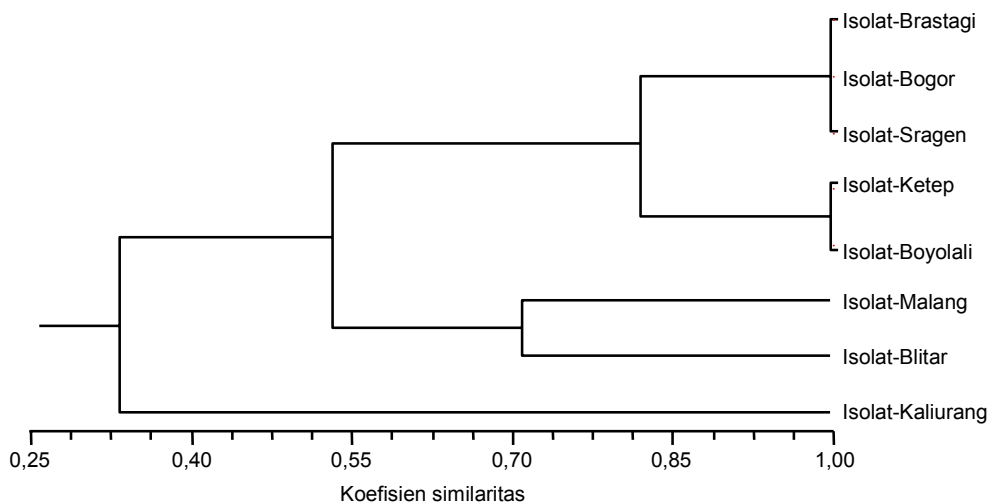
Keragaman Genetik Berdasarkan PCR-RFLP

Untuk melihat keragaman genetik delapan isolat Begomovirus tersebut, profil fragmen restriksi dari amplikon diskor dan dianalisis menggunakan program NTSYSp-2.1. Dendrogram hasil analisis isolat-isolat Begomovirus berdasarkan PCR-RFLP ditampilkan pada Gambar 4.

Hasil analisis menunjukkan bahwa pada tingkat similaritas 70%, isolat-isolat Begomovirus dari 8 daerah



Gambar 3. Pola pita hasil pemotongan fragmen DNA produk PCR dari 8 isolat Begomovirus asal tanaman tomat dari 8 daerah yang berbeda. 1 = Brastagi, 2 = Bogor, 3 = Sragen, 4 = Malang, 5 = Blitar, 6 = Magelang, 7 = Kaliurang, 8 = Boyolali (pada Gambar 3B: 7 = Boyolali, 8 = Kaliurang) dengan enzim restriksi A = *Dral*, B = *EcoRI*, C = *RsaI*, D = *PstI*, M = 100 bp marker.



Gambar 4. Dendrogram hasil analisis fragmen DNA restriksi dari 8 isolat Begomovirus asal tanaman tomat dari 8 daerah yang berbeda menggunakan program NTSYSpc-2.1.

yang berbeda terbagi menjadi 3 kelompok besar (Gambar 4). Kelompok 1 terdiri atas isolat Brastagi, Bogor, Sragen, Ketep, dan Boyolali. Sedangkan kelompok 2, terdiri atas isolat Malang dan Blitar. Isolat Kaliurang terpisah dengan dua kelompok yang lain dan berada pada kelompok 3.

Berdasarkan pohon filogenetik, secara geografis terdapat beberapa isolat yang berasal dari daerah yang berdekatan berada pada satu kelompok, seperti isolat Ketep (Magelang) dengan Boyolali dan isolat Malang dengan Blitar. Namun demikian, hal sebaliknya juga terjadi di mana isolat-isolat yang berasal dari daerah dengan jarak yang berjauhan, berada pada kelompok yang sama, yaitu isolat Brastagi (Medan), Bogor (Jawa Barat), dan Sragen (Jawa Tengah) dengan tingkat

similaritas 100%. Adanya distribusi tomat dari satu daerah ke daerah yang lain dimungkinkan sebagai penyebab terjadinya penyebaran Begomovirus tersebut ke beberapa daerah. Seperti diketahui bahwa Begomovirus merupakan virus yang ditularkan oleh vektor serangga kutukebul (*Bemisia tabaci*, famili *Aleyrodidae*) dengan cara persisten sirkulatif (Brown dan Czosnek 2002). Di samping buah tomat yang telah terserang virus ini, serangga kutukebul yang terikut sewaktu distribusi buah tomat mungkin dapat menularkan virus yang dibawanya.

Untuk melihat adanya tingkat keragaman genetik Begomovirus lokal Indonesia dengan Begomovirus dari DNA database maka dilakukan analisis perbandingan fragmen-fragmen DNA berdasarkan PCR-RFLP dan

fragmen DNA hasil prediksi RFLP. Ukuran fragmen dari isolat Begomovirus, baik isolat lokal Indonesia maupun isolat-isolat dari DNA database bank gen ditampilkan pada Tabel 1, 2, 3, dan 4.

Hasil analisis menunjukkan adanya variasi baik dari ukuran maupun jumlah fragmen DNA yang dihasilkan ketika fragmen yang berukuran sekitar 1.500 bp dipotong dengan berbagai enzim restriksi. Variasi yang paling tinggi dihasilkan oleh pemotongan dengan enzim restriksi *RsaI* (Tabel 3) di mana dihasilkan 15 fragmen dengan ukuran yang berbeda. Sedangkan variasi yang paling sedikit ditunjukkan oleh hasil pemotongan

dengan enzim *EcoRI* (Tabel 2). Dari Tabel 2 juga terlihat bahwa beberapa isolat Begomovirus bahkan tidak mempunyai situs enzim restriksi ini.

Hasil analisis filogenetik berdasarkan fragmen situs restriksi dan fragmen prediksi RFLP menghasilkan dendrogram yang menggambarkan adanya identitas dan keragaman genetik di antara isolat-isolat Begomovirus (Gambar 5). Secara umum, isolat-isolat Begomovirus terbagi dalam tiga kelompok. Delapan isolat Begomovirus dalam studi ini tersebar di antara ketiga kelompok tersebut. Kelompok 1, terdiri atas lima isolat Begomovirus pada studi ini dan dua isolat Begomo-

Tabel 1. Ukuran fragmen DNA yang dihasilkan dari pemotongan produk PCR dari 8 isolat Begomovirus asal tomat dan prediksi RFLP isolat-isolat dari DNA database menggunakan enzim restriksi *DraI*.

Isolat Begomovirus	Ukuran fragmen DNA (bp)								
	-	-	-	650*	-	-	-	200	-
Isolat-Brastagi	-	-	-	650*	-	-	-	200	-
Isolat-Bogor	-	-	-	650*	-	-	-	200	-
Isolat-Sragen	-	-	-	650*	-	-	-	200	-
Isolat-Malang	-	850	-	-	-	-	450	200	-
Isolat-Blitar	-	-	-	650*	-	-	-	200	-
Isolat-Ketep	-	-	-	650*	-	-	-	200	-
Isolat-Kaliurang	-	-	-	650*	-	-	-	200	-
Isolat-Boyolali	-	-	-	650*	-	-	-	200	-
AYVV-Cina**	-	-	-	650	550	-	-	200	100
AYVV-Taiwan**	-	-	-	650	550	-	-	200	100
ToLCV-Laos**	-	-	-	650*	-	-	-	200	-
ToLCV-Java**	-	850	-	650	-	-	-	-	-
ToLCV-Malaysia**	1300	-	-	-	-	-	-	200	-
ToLCV-Java (A)**	-	-	-	-	550	500	-	200*	-
ToLCV-Filipina**	1300	-	-	-	-	-	-	200	-
ToLCV-Vietnam**	-	-	800	-	-	500	-	200	-
TYLCV-China**	-	-	-	-	-	-	-	200	-
ToLCV-Taiwan**	-	-	800	-	-	500	-	200	-
ToLCV-Bangladesh**	1300	-	-	-	-	-	-	200	-

*Terdapat dua fragmen dengan ukuran yang sama, **data diambil dari situs web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

Tabel 2. Ukuran fragmen DNA yang dihasilkan dari pemotongan produk PCR dari 8 isolat Begomovirus asal tomat dan prediksi RFLP isolat-isolat dari DNA database menggunakan enzim restriksi *EcoRI*.

Isolat Begomovirus	Ukuran fragmen DNA (bp)		
	-	-	-
Isolat-Brastagi	-	-	650
Isolat-Bogor	-	-	650
Isolat-Sragen	-	-	650
Isolat-Malang	1500	-	-
Isolat-Blitar	1500	-	-
Isolat-Ketep	-	1000	-
Isolat-Kaliurang	1500	-	500
Isolat-Boyolali	-	1000	-
AYVV-Cina**	1500	-	-
AYVV-Taiwan**	1500	-	-
ToLCV-Laos**	1500	-	-
ToLCV-Java**	-	-	650
ToLCV-Malaysia**	1500	-	-
ToLCV-Java (A)**	-	-	650
ToLCV-Filipina**	1500	-	-
ToLCV-Vietnam**	-	1000	-
TYLCV-Cina**	1500	-	-
ToLCV-Taiwan**	1500	-	-
ToLCV-Bangladesh**	1500	-	-

**Data diambil dari situs web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

Tabel 3. Ukuran fragmen DNA yang dihasilkan dari pemotongan produk PCR dari 8 isolat Begomovirus asal tomat dan prediksi RFLP isolat-isolat dari DNA database menggunakan enzim restriksi *RsaI*.

Isolat Begomovirus	Ukuran fragmen DNA (bp)													
Isolat-Brastagi	1300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	-	-
Isolat-Bogor	1300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	-	-
Isolat-Sragen	1300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	-	-
Isolat-Malang	-	-	-	-	-	700	-	350	-	250	-	200	-	-
Isolat-Blitar	-	-	-	-	-	700	-	350*	-	-	-	-	100	-
Isolat-Ketep	1300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	-	-
Isolat-Kaliurang	-	-	-	-	-	700	400	-	300	-	-	-	100	-
Isolat-Boyolali	1300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	100	-
AYVV-Cina**	-	-	-	-	-	700	-	-	-	250	-	200*	100	50
AYVV-Taiwan**	-	1200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	100	-
ToLCV-Laos**	-	-	-	1050	-	-	-	-	-	-	-	200	100*	50
ToLCV-Java**	-	-	1100	-	-	-	-	-	-	-	-	200	100*	-
ToLCV-Malaysia**	-	-	-	-	750	-	-	-	300	-	-	200	100*	50
ToLCV-Java (A)**	-	-	1100	-	-	-	-	-	-	-	-	200	100*	-
ToLCV-Filipina**	-	-	-	-	-	700	-	-	300	250	-	200	-	50
ToLCV-Vietnam**	-	-	-	-	950	-	-	-	-	250	-	200	100	-
TYLCV-Cina**	1300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	-	-
ToLCV-Taiwan**	1300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100*	-
ToLCV-Bangladesh**	-	-	-	-	-	700	-	350	-	-	-	200	100*	50

*Terdapat dua fragmen dengan ukuran yang sama, **data diambil dari situs web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

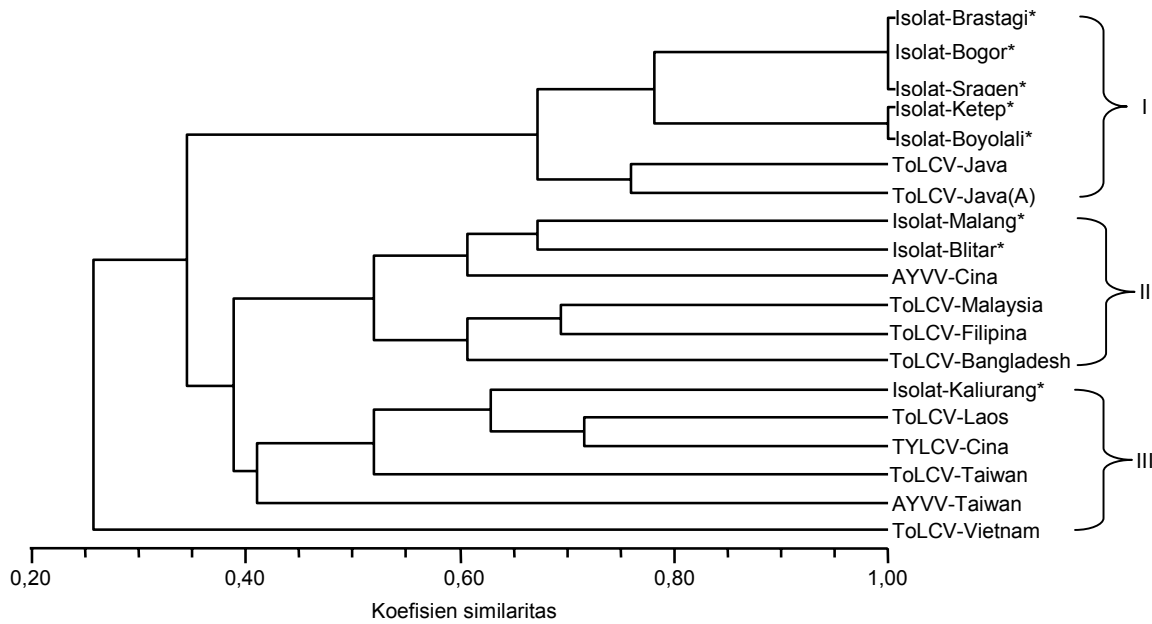
Tabel 4. Ukuran fragmen DNA yang dihasilkan dari pemotongan produk PCR dari 8 isolat Begomovirus asal tomat dan prediksi RFLP isolat-isolat dari DNA database menggunakan enzim restriksi *PstI*.

Isolat Begomovirus	Ukuran fragmen DNA (bp)													
Isolat-Brastagi	-	-	-	-	950	550	-	-	-	-	-	-	-	-
Isolat-Bogor	-	-	-	-	950	550	-	-	-	-	-	-	-	-
Isolat-Sragen	-	-	-	-	950	550	-	-	-	-	-	-	-	-
Isolat-Malang	-	-	-	-	950	550	-	-	-	-	-	-	-	-
Isolat-Blitar	-	-	-	-	950	550	-	-	-	-	-	-	-	-
Isolat-Ketep	-	-	-	-	950	550	-	-	-	-	-	-	-	-
Isolat-Kaliurang	1500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isolat-Boyolali	-	-	-	-	950	550	-	-	-	-	-	-	-	-
AYVV-Cina**	-	-	-	-	950	550	-	-	-	-	-	-	-	-
AYVV-Taiwan**	-	-	1200	-	-	-	-	300	-	-	-	-	-	-
ToLCV-Laos**	1500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ToLCV-Java**	-	-	-	-	950	550	-	-	-	-	-	-	-	-
ToLCV-Malaysia**	-	-	-	-	950	550	-	-	-	-	-	-	-	-
ToLCV-Java (A)**	-	-	-	-	950	550	-	-	-	-	-	-	-	-
ToLCV-Filipina**	-	-	-	-	950	550	-	-	-	-	-	-	-	-
ToLCV-Vietnam**	-	-	-	1000	-	-	-	450	-	-	-	50	-	-
TYLCV-Cina**	1500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ToLCV-Taiwan**	1500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ToLCV-Bangladesh**	1500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Data diambil dari situs web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

virus dari database (*ToLCV-Java* dan *ToLCV-Java* [*Ageratum*]). Pada kelompok 1 ini juga terlihat bahwa isolat Brastagi, Bogor, Sragen, Ketep, dan Boyolali mempunyai identitas yang mirip dengan isolat *ToLCV-Java* dan *ToLCV-Java*[*Ageratum*]. Ini berarti bahwa isolat Brastagi, Bogor, Sragen, Ketep, dan Boyolali merupakan isolat *Tomato Leaf Curl Virus* (*ToLCV*). Isolat *ToLCV-Java* dan *ToLCV-Java*[*Ageratum*] telah diidentifikasi dan dikarakterisasi secara molekuler oleh Kon *et al.* (2006). Kelompok 2 terdiri atas isolat Malang dan Blitar serta empat isolat dari database, yaitu AYVV-Cina, *ToLCV-Malaysia*, *ToLCV-Filipina*, dan *ToLCV-Bangladesh*. Dari kelompok ini juga terlihat bahwa isolat Malang dan Blitar mempunyai identitas yang mirip

dengan *Ageratum Yellow Vein Virus* dari Cina (AYVV-Cina) (Gambar 5). Hal ini mengindikasikan bahwa isolat Malang dan Blitar termasuk kelompok *Ageratum Yellow Vein Virus* (AYVV). Kelompok 3 terdiri atas isolat Kaliurang (*ToLCV-Kaliurang*) dan 5 isolat dari database, yaitu *ToLCV-Laos*, *TYLCV-Cina*, *ToLCV-Taiwan*, AYVV-Taiwan, dan *ToLCV-Vietnam*. Pada kelompok 3 ini juga terlihat bahwa isolat Kaliurang mempunyai identitas genetik yang lebih dekat dengan *ToLCV-Laos* atau *TYLCV-Cina*. Hal ini mengindikasikan bahwa isolat Malang mungkin termasuk dalam kelompok *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (*TYLCV*).



Gambar 5. Dendrogram hasil analisis berdasarkan fragmen situs restriksi Begomovirus 8 isolat lokal Indonesia dan isolat dari database bank gen menggunakan program NTSYSpc-2.1. Isolat dari database adalah AYVV-Cina (*Ageratum Yellow Vein China Virus*-[G68], AJ849916), AYVV-Taiwan (*Ageratum Yellow Vein Taiwan Virus*-[Taiwan] AF307861), ToLCV-Laos (*Tomato Leaf Curl Laos Virus*, AF195782), ToLCV-Java (*Tomato Leaf Curl Java Virus*, AB100304), ToLCV-Malaysia (*Tomato Leaf Curl Malaysia Virus*, AF327436), ToLCV-Vietnam (*Tomato Leaf Curl Vietnam Virus*, AF264063), TYLCV-Cina (*Tomato Yellow Leaf Curl China Virus-Tb[Y10]*, CAC85506.1), ToLCV-Taiwan (*Tomato Leaf Curl Taiwan Virus*, ABB69690.1), ToLCV-Filipina (*Tomato Leaf Curl Philippine Virus*, AB050597), ToLCV-Java[A] (*Tomato Leaf Curl Java Virus-[Ageratum]*, AB162141), ToLCV-Bangladesh (*Tomato Leaf Curl Bangladesh Virus*, NC_004614).

Hasil analisis keragaman genetik juga mengindikasikan adanya keragaman genetik di antara isolat-isolat Begomovirus yang dianalisis (Gambar 5). Adanya keragaman genetik yang cukup tinggi ini diduga karena adanya rekombinasi genetik di antara isolat-isolat Begomovirus. Seperti dijelaskan oleh Kitamura *et al.* (2004) bahwa rekombinasi pada Begomovirus merupakan sebuah fenomena yang sering terjadi dan dapat terjadi di antara spesies Begomovirus yang sama bahkan di dalam atau antar genus.

Implikasi dari adanya keragaman genetik Begomovirus yang tinggi ini adalah dapat menjadi pertimbangan bagi pemulia tanaman tomat di dalam usaha untuk mengembangkan tanaman yang tahan. Suatu varietas yang tahan terhadap satu isolat Begomovirus tertentu belum tentu akan tahan terhadap isolat Begomovirus yang lain. Dengan demikian, pengembangan varietas tahan dapat diarahkan untuk merakit satu varietas yang dapat tahan terhadap beberapa isolat Begomovirus yang ada atau dengan merakit beberapa varietas yang tahan terhadap masing-masing isolat Begomovirus.

Analisis keragaman genetik Begomovirus dengan menggunakan teknik PCR-RFLP dapat memberikan

adanya polimorfisme pola genetik di antara isolat-isolat Begomovirus yang dipelajari. Teknik ini sebelumnya juga telah digunakan juga untuk identifikasi dan studi variasi genetik pada spesies Begomovirus namun dengan jenis enzim yang berbeda (Rojas *et al.* 1993, Aidawati *et al.* 2005). Namun demikian, teknik ini masih terdapat kekurangan di mana keragaman genetik yang diperoleh hanya berdasarkan pada beberapa basa nukleotida dari enzim restriksi yang digunakan, sehingga belum mencakup seluruh genom Begomovirus. Dengan demikian, keragaman genetik yang dihasilkan mungkin belum menggambarkan variasi genetik Begomovirus yang sesungguhnya. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mempelajari keragaman genetik geminivirus menggunakan teknik lain yang lebih akurat, seperti analisis sekuen nukleotida atau asam amino. Selain itu, perlu dilakukan kajian hubungan antara identitas genetik dengan tingkat virulensi dari Begomovirus yang dipelajari.

KESIMPULAN

Hasil amplifikasi PCR mengindikasikan bahwa tanaman tomat sakit dari 8 daerah yang berbeda terbukti terinfeksi oleh isolat Begomovirus. Hasil pemo-

tongan fragmen DNA Begomovirus menggunakan empat macam enzim restriksi menunjukkan adanya polimorfisme fragmen DNA dari isolat-isolat Begomovirus yang dianalisis.

Dari dendrogram pengelompokan berdasarkan analisis pola pita DNA hasil PCR-RFLP menunjukkan bahwa isolat Brastagi, Bogor, Sragen, Ketep, dan Boyolali termasuk ke dalam kelompok ToLCV, isolat Malang dan Blitar termasuk dalam kelompok AYYV, sedangkan isolat Kaliurang termasuk ke dalam kelompok TYLCV.

Analisis keragaman genetik berdasarkan analisis PCR-RFLP menunjukkan bahwa isolat Begomovirus dari 8 daerah yang berbeda terbagi menjadi 3 kelompok. Kelompok 1 terdiri atas isolat Brastagi, Bogor, Sragen, Ketep, dan Boyolali. Kelompok 2 terdiri atas isolat Malang dan Blitar, sedangkan isolat Kaliurang berada pada kelompok 3.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada USAID-Agricultural Botechnology Support Project II (USAID-ABSP II), berjudul "*Development of Multiple Viruses Resistant Tomato*", dengan No. *Task Order* 18. TJS dan proyek PAATP yang telah memberikan sebagian biaya penelitian dan beasiswa program doktor di Program Studi Agronomi, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrios, G.N. 1997.** Plant Pathology. 4^{ed}. Academic Press, New York.
- Aidawati, N., S.H. Hidayat, R. Suseno, P. Hidayat, dan S. Sujiprihati. 2005.** Identifikasi geminivirus yang menginfeksi tomat berdasarkan pada teknik *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*. J. Mikrobiol. Indon. 10:29-32.
- Brown, J.K. and H. Czosnek. 2002.** Whitefly transmission of plant viruses. Adv. Bot. Res. 36:65-100.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990.** Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.
- Green, S.K. and G. Kalloo. 1994.** Leaf curl and yellowing viruses of pepper and tomato: An overview. Technical Bulletin No. 21. Asian Vegetables Research and Development Center. Tainan, ROC
- Hidayat, S.H., E.S. Rusli, dan N. Aidawati. 1999.** Penggunaan primer universal dalam *Polymerase Chain Reaction* untuk mendeteksi virus gemini pada cabe. Prosiding Seminar Ilmiah dan Kongres Nasional XV Perhimpunan Fitopatologi Indonesia, Purwokerto.
- Kitamura, K., A. Murayama, and M. Ikegami. 2004.** Evidence for recombination among isolates of tobacco leaf curl Japan virus and honeysuckle yellow vein mosaic virus. Arch. Virol. 149:1221-1229.
- Kon, T., S.H. Hidayat, S. Hase, H. Takahashi, and M. Ikegami. 2006.** The natural occurrence of two distinct begomovirus associated with DNA β and a recombinant DNA in a tomato plant. Phytopathology 96:517-525.
- Polkela, M.A., E. Svensson, A. Rojas, T. Horko, L. Paulin, J.P.T Valkonen, and A. Kvarnheden. 2005.** Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. Plant Pathol. 54:448-459.
- Rodriguez, P.E., F.M. Zerbini, and D.A. Ducasse. 2006.** Genetic diversity of Begomovirus infecting soybean, bean and associated weeds in Mortwestern Argentina. Fitopatol. Bras. 31:342-348.
- Rojas, M.R., R.L. Gilbertson, D.R. Russel, and D.P. Maxwell. 1993.** Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminivirus. Plant Dis. 77:340-347.
- Santoso, T.J., S.A. Duriat, dan S.H. Hidayat. 2007.** Deteksi geminivirus pada tomat menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Jurnal Widya Riset 9(4). (*In press*).
- Sudiono, S.H. Hidayat, R. Suseno, dan S. Sosromarsono. 2001.** Molecular detection and host range study of tomato-infecting begomovirus. Prosiding Seminar Perhimpunan Fitopatologi Indonesia.
-