

APLIKASI TEKNIK MOLEKULER UNTUK ANALISIS GENETIK TOMATO LEAF CURL VIRUS

Application of Molecular Technique for Genetic Analysis of Tomato Leaf Curl Virus

Tri Joko Santoso

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian,
Jalan Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975, 8339793, Faks. (0251) 8338820
E-mail: bb_biogen@litbang.deptan.go.id, trijsant@yahoo.com

Diajukan: 5 April 2013; Disetujui: 4 Oktober 2013

ABSTRAK

Tomato leaf curl virus (ToLCV) merupakan salah satu virus dalam genus *Begomovirus*, famili Geminiviridae, yang menyebabkan penyakit keriting daun pada tomat. Informasi tentang keragaman genetik ToLCV bermanfaat dalam perakitan tanaman tahan. Kemajuan di bidang biologi molekuler telah menghasilkan beberapa teknik yang dapat digunakan untuk analisis genetik *Begomovirus*. Teknik molekuler yang banyak diaplikasikan ialah *polymerase chain reaction* (PCR). Teknik ini sangat sensitif dan spesifik untuk mendeteksi *Begomovirus* pada tingkat DNA. PCR juga dapat digunakan untuk mengidentifikasi tingkat keragaman genetik virus. Teknik PCR telah digunakan untuk mendeteksi *Begomovirus* pada tomat (ToLCV) dari sentra produksi di Jawa Timur, Jawa Tengah, Jawa Barat, DI Yogyakarta, dan Sumatera. Kombinasi teknik PCR dengan *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) juga dapat digunakan untuk mengidentifikasi keragaman genetik *Begomovirus*. Selain itu, teknik sekuensing DNA dapat diaplikasikan untuk mempelajari identitas dan keragaman genetik isolat-isolat ToLCV atau anggota *Begomovirus* lainnya. Analisis sekuen asam amino menunjukkan adanya keragaman genetik dari isolat-isolat ToLCV Indonesia. Isolat-isolat tersebut homolog dengan *Ageratum yellow vein virus* (AYVV). Dengan teknik modifikasi gen (rekayasa genetik) telah berhasil memanfaatkan gen AV1 (*coat protein*) dari ToLCV untuk menghasilkan tanaman tembakau tahan terhadap ToLCV. Teknik modifikasi gen memberikan peluang yang besar untuk mengembangkan tanaman tomat tahan ToLCV dan berperan penting dalam pembangunan pertanian modern di masa mendatang.

Kata kunci: Tomat, ToLCV, teknik molekuler, keragaman genetik

ABSTRACT

Tomato leaf curl virus (ToLCV) is a virus of the genus *Begomovirus*, family Geminiviridae, causing leaf curl disease on tomato. Information about the genetic diversity of the virus can be useful in plant breeding program. Advances in molecular biology have generated some techniques that can be used for genetic analysis of *Begomoviruses*. Molecular technique widely applied for this purpose is polymerase chain reaction (PCR). This technique is highly sensitive and specific for detecting *Begomovirus* at the DNA level. PCR can also be used to determine genetic diversity of the virus. PCR techniques have been used to detect *Begomovirus* associated with

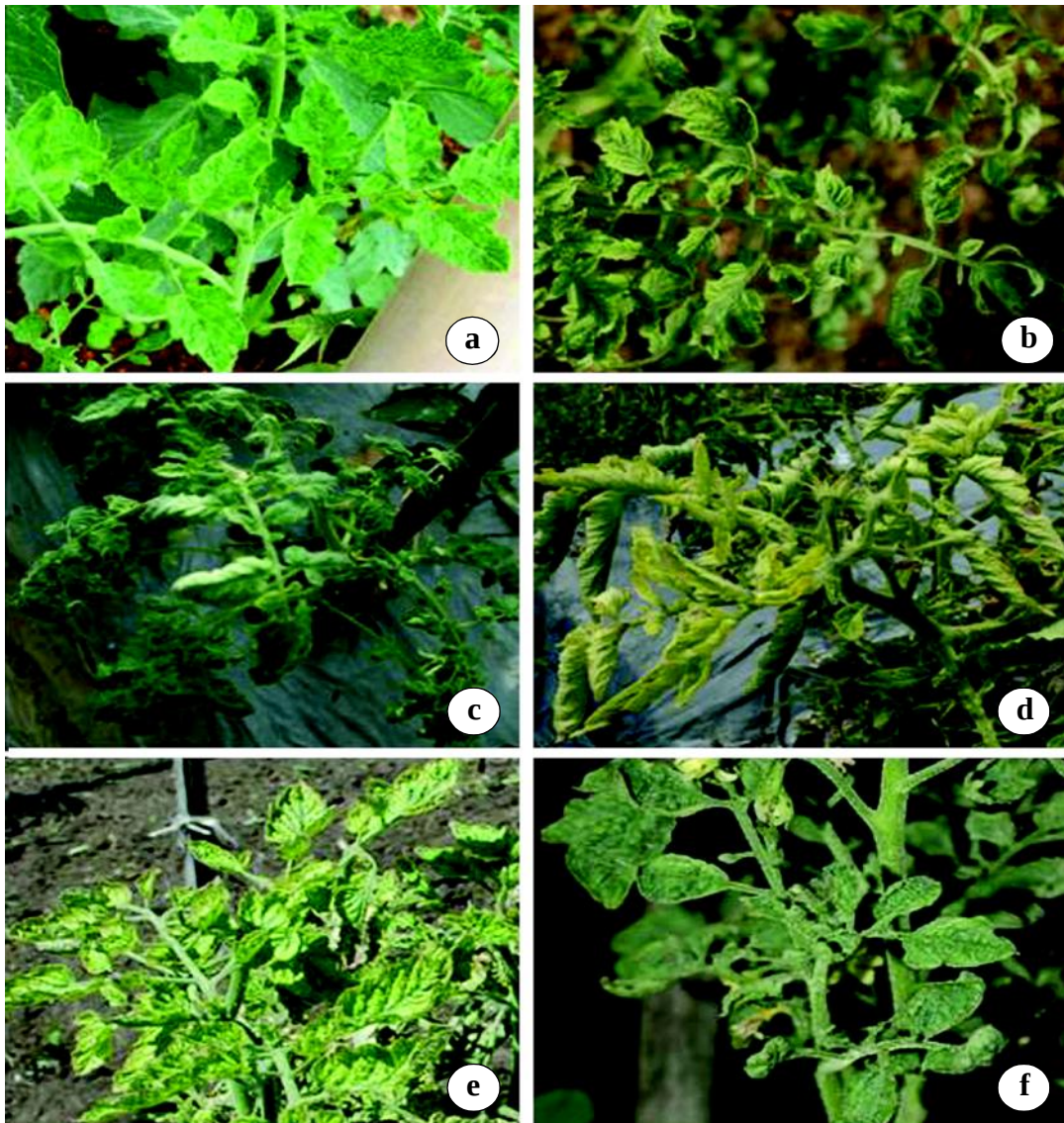
tomatoes (ToLCV) from East Java, Central Java, West Java, Yogyakarta, and Sumatra. Combination of PCR with restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique has also been used to identify genetic diversity of *Begomovirus*. DNA sequencing technique has been applied to identify the genetic diversity of ToLCV or other *Begomovirus*. Based on the analysis of amino acid sequences, it has been obtained information related to genetic diversity of the ToLCV isolates. The isolates were homolog with *Ageratum yellow vein virus* (AYVV). Meanwhile, gene modification (genetic engineering) techniques have been successfully utilized AV1 (*coat protein*) gene isolated from ToLCV to generate tobacco plant that resistant to ToLCV. Gene modification techniques greatly provide opportunities to develop ToLCV resistant tomato and have an important role in modern agriculture in the future.

Keywords: Tomato, ToLCV, molecular techniques, genetic diversity

PENDAHULUAN

Virus daun (kuning) keriting yang menyebabkan penyakit keriting daun pada tomat (*tomato leaf curl virus*, ToLCV) merupakan salah satu anggota genus *Begomovirus* (famili Geminiviridae). Penyakit ini menjadi salah satu kendala serius dalam sistem produksi tomat di seluruh dunia. Tanaman yang terinfeksi virus ini menunjukkan gejala pertumbuhan terhambat, daun menguning dan keriting, serta tanaman menjadi kerdil (Gambar 1).

ToLCV dapat menginfeksi tanaman tomat muda maupun tua, baik di lapangan terbuka maupun di rumah kaca. Infeksi virus dapat menyebabkan kehilangan hasil hingga 100% apabila infeksi terjadi saat tanaman masih muda. Virus ini telah ditemukan di beberapa negara tropis, subtropis, dan mediterania seperti negara-negara di Timur Tengah, Eropa Barat Daya, Afrika, Asia Tenggara, dan Kepulauan Karibia, bahkan di daerah beriklim sedang (Moriones dan NavasCatillo 2000) dengan intensitas antara 20–100% dan dapat menyebabkan kehilangan hasil sampai 100%. Di Indonesia, serangan yang berat dapat mencapai 90–100% dan menurunkan hasil antara 50–100% (AVRDC 2003). Sudiono *et al.* (2004) melaporkan serangan virus daun kuning keriting pada tomat di daerah Bogor



Gambar 1. Morfologi gejala tanaman tomat yang diduga terinfeksi ToLCV di beberapa lokasi: (a) Wanasari, Sukabumi; (b) Cibitung, Bogor; (c) Karangpandan, Sragen; (d) Kaliurang, Yogyakarta; (e) Batu, Malang, dan (f) Pare, Blitar (Santoso 2008).

dan sekitarnya mencapai 50–70%. Sementara Santoso *et al.* (2008a) menyatakan insidensi penyakit keriting daun yang disebabkan oleh ToLCV dapat mencapai 100%. Tulisan ini menguraikan aplikasi teknik molekuler untuk analisis ToLCV yang ada di Indonesia.

KARAKTERISTIK GENUS *BEGOMOVIRUS*

ToLCV adalah virus yang berasal dari salah satu kelompok virus tanaman yang terbesar dan penting, yaitu virus gemini dari genus *Begomovirus* famili Geminiviridae. Kelompok virus gemini meliputi berbagai virus yang menginfeksi sejumlah spesies tanaman monokotil maupun dikotil. Virus gemini secara struktural mempunyai morfo-

logi berupa partikel virion isometrik kembar yang berpasangan (*twinned-geminate*) yang berukuran 18–30 nm, dan secara genetik mempunyai sebuah DNA genom yang terdiri atas satu atau dua molekul DNA berutas tunggal (ssDNA) berbentuk sirkuler. Famili Geminiviridae terdiri atas empat genus, yaitu *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus*, dan *Begomovirus* (van Regenmortel *et al.* 1999), yang dapat dibedakan berdasarkan organisasi genetik, tanaman inang, dan vektor yang menginfeksi.

Genom *Begomovirus* dapat berupa monopartit (Mediterrania, Amerika Tengah dan Utara, serta sebagian negara di Asia) atau bipartit (Thailand). Genom bipartit *Begomovirus* terdiri atas dua komponen ssDNA (DNA A dan DNA B) dengan ukuran hampir sama, yaitu sekitar 2,6–2,8 kb. Urutan nukleotida DNA A dan DNA B berbeda, kecuali *common region* pendek berukuran sekitar 200

nukleotida yang sangat mirip. Daerah tersebut meliputi sebuah struktur *stem-loop* yang mengandung nano-nukleotida TAATATTAC, yang merupakan sekuen konservatif pada genom empat genus virus gemini dan meliputi sekuen origin untuk replikasi *rolling circle* (Zhou *et al.* 2003).

Komponen DNA A dan DNA B mengandung gen-gen yang menyandikan protein pada utas sense virus (*v-sense*) dan utas sense komplementer (*c-sense*). Komponen DNA A mengandung satu gen (AV1) pada *v-sense* dan tiga gen (AC1, AC2, dan AC3) pada *c-sense*. Gen AV1 menyandikan protein selubung (*capsid protein*, CP) yang digunakan untuk menyelubungi genom dan juga sangat penting untuk penyebaran virus (Briddon *et al.* 1989). Produk CP dan pre-CP (V2) juga penting untuk pergerakan lokal atau sistemik, yaitu untuk keluar masuk genom virus dari inti sel inang. Komponen AV1 juga berperan dalam melindungi ssDNA virus dan penularan oleh serangga vektor. Protein ini juga penting untuk perpindahan virus ketika masuk ke dalam sistem pencernaan serangga kutu kebul untuk melindungi partikel virus dari degradasi.

Komponen DNA B mempunyai satu gen (BV1) pada *v-sense* dan satu gen (BC1) pada *c-sense*. Produk protein dari gen BV1 ditempatkan pada inti sel dan berfungsi mengikat DNA, sehingga genom virus yang baru dibentuk dapat dipindahkan ke sitoplasma. Produk protein BC1 ditempatkan pada dinding sel dan membran seluler, dan berfungsi untuk meningkatkan kerja eksklusif plasmodesmata dalam pergerakan virus dari sel ke sel. Kedua *movement protein* ini berhubungan dalam penentuan kisaran inang virus, tetapi hanya gen BC1 yang berperan dalam menentukan keparahan gejala dan patogenisitas *Begomovirus*. Contoh virus yang termasuk kelompok ini ialah *bean golden mosaic virus* (BGMV) dan *tomato (yellow) leaf curl virus* (TYLCV/ToLCV) (van Regenmortel *et al.* 1999).

Begomovirus ditularkan oleh kutu kebul (*Bemisia tabaci*, ordo Hemiptera, famili Aleyrodidae) dengan sifat penularan persisten, sirkulatif, dan nonpropagatif (Brown dan Czosnek 2002). Periode makan akuisisi dan inokulasi minimum telah banyak dilaporkan untuk berbagai jenis *Begomovirus*, yaitu masing-masing 10–60 menit dan 10–30 menit. Periode laten virus ini dalam vektor lebih dari 20 jam. Virus dapat bertahan di dalam vektor lebih dari 20 hari, tetapi tidak sepanjang masa hidup vektor (kutub kebul). Virus dapat dibawa oleh serangga fase larva atau dewasa, tetapi tidak diturunkan ke keturunannya.

Infeksi *Begomovirus* dapat ditemukan pada beberapa tanaman penting, seperti kacang-kacangan, mentimun, tomat, cabai, dan ubi kayu pada daerah tropis dan subtropis, serta beberapa rumput (Ambrozevicius *et al.* 2002). Di beberapa negara di Timur Tengah, Eropa Barat Daya, Afrika Tropis, Asia Timur dan Tenggara, dan Australia, *Begomovirus* yang menyerang tanaman tomat ialah *tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) atau *tomato leaf curl virus* (ToLCV) (Zeidan *et al.* 1998). Sedikitnya 17 *Begomovirus* telah dilaporkan menginfeksi tomat di

Amerika dan Karibia, seperti *Texas pepper virus*, TYLCV, ToMoV, TGMV, dan *tomato yellow mosaic virus* (TYMV).

TEKNIK PCR UNTUK DETEKSI INFEKSI ToLCV

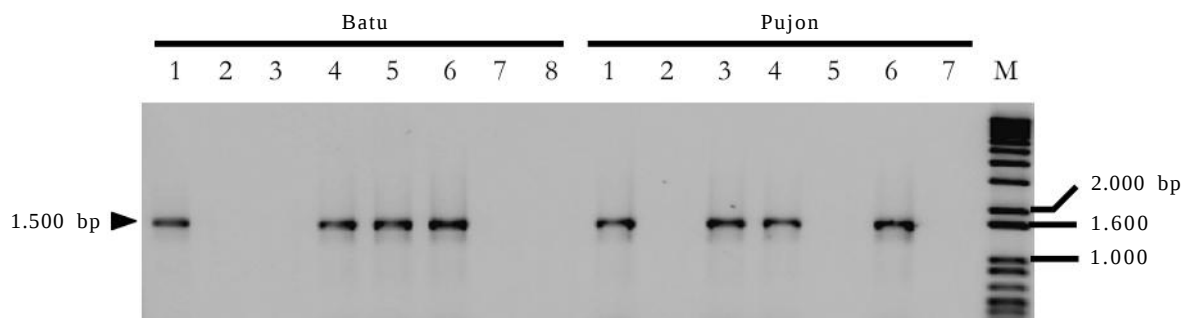
Kejadian penyakit yang berasosiasi dengan *Begomovirus* di beberapa sentra produksi tomat berpotensi menjadi ancaman serius pada sistem produksi tomat. Beberapa teknik telah digunakan untuk mendeteksi keberadaan *Begomovirus* (ToLCV) dan akumulasinya pada jaringan tanaman. Metode serologi menjadi cara yang rutin digunakan untuk mendeteksi dan mendiagnosis virus.

Metode serologi atau imunoasai seperti *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) menggunakan antiserum yang disiapkan untuk mendeteksi virus tertentu. Antiserum dengan bantuan bufer alkalin digunakan pada *plate* plastik mikrotiter untuk menguji cairan tanaman yang terinfeksi virus. Beberapa jenis teknik ELISA ialah *double antibody sandwich*-ELISA (DAS-ELISA) dan *triple antibody sandwich*-ELISA (TAS-ELISA). Azza *et al.* (2005) menggunakan DAS-ELISA untuk mengidentifikasi SqLCV pada squash. TAS-ELISA dengan monoklonal antibodi telah digunakan untuk mendeteksi *Begomovirus* pada tomat (Pico *et al.* 1999). Selain itu, teknik *indirect*-ELISA (I-ELISA) telah digunakan untuk mengidentifikasi *Begomovirus* yang menginfeksi cabai merah (Mudmainah dan Purwanto 2010).

Teknik ELISA relatif lebih murah, khususnya apabila antiserum dapat diproduksi secara lokal, dan juga cukup memadai untuk diagnosis virus. Namun, metode deteksi serologi mempunyai beberapa kelemahan, di antaranya rendahnya titer dari antigen, adanya reaksi silang antibodi dengan antigen heterolog, dan adanya pengaruh pengaturan produksi antibodi oleh lingkungan dan tahap perkembangan tanaman. Oleh karena itu, diperlukan metode deteksi virus lain yang lebih cepat dan akurat.

Kemajuan di bidang biologi molekuler telah menghadirkan beberapa teknik yang dapat digunakan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi virus, salah satunya ialah *polymerase chain reaction* (PCR). Teknik ini sangat sensitif dan spesifik untuk mendeteksi dan mengidentifikasi virus yang menginfeksi tanaman. Spesifisitas PCR didasarkan pada penggunaan primer-primer oligonukleotida yang komplementer dengan daerah yang mengait sekuen DNA yang diamplifikasi.

Teknik PCR telah digunakan untuk mendeteksi infeksi ToLCV (*Begomovirus*) Indonesia dengan menggunakan sepasang primer *degenerate* PAL1v1978-F dan PAR1c715-R (Aidawati *et al.* 2005; Sukanto *et al.* 2005; Santoso 2008). Sampel-sampel tanaman tomat sakit dari beberapa daerah di Jawa Timur, Jawa Tengah, DI Yogyakarta, dan Jawa Barat telah dianalisis dengan PCR dan mengindikasikan adanya infeksi *Begomovirus*. Infeksi *Begomovirus* ditunjukkan oleh adanya pita DNA hasil amplifikasi PCR yang berukuran 1.500 bp (Gambar 2).



Gambar 2. Deteksi ToLCV (*Begomovirus*) dengan teknik PCR menggunakan primer universal pada tanaman tomat sakit yang dikoleksi dari daerah Batu dan Pujon, Malang, Jawa Timur. M = Marka 1 Kb plus (Invitrogen) (Santoso *et al.* 2008a).

Teknik PCR juga telah digunakan untuk mendeteksi virus gemini penyebab penyakit daun keriting pada tanaman cabai (Rusli 2000; Sulandari *et al.* 2006).

Rampersad dan Umaharan (2003) telah mengembangkan suatu teknik untuk mendeteksi *Begomovirus* menggunakan PCR. Ada tiga teknik PCR yang digunakan yaitu PCR standar, PCR penempelan langsung (*direct-binding* PCR), dan *immunocapture* PCR. Teknik *immunocapture* PCR menggunakan interaksi antibodi-antigen untuk mengikat virus, kemudian digunakan sebagai cetakan untuk analisis PCR. Teknik ini paling efektif untuk mendeteksi *Begomovirus*.

Metode deteksi virus dengan PCR mempunyai keuntungan antara lain membutuhkan sampel DNA dalam jumlah sedikit, yang dapat diperoleh dari jaringan tanaman segar, jaringan yang telah disimpan dalam lemari es, atau jaringan yang telah kering. Selain itu deteksinya tidak dipengaruhi oleh tahap perkembangan tanaman dan lingkungan. Teknik ini sangat bermanfaat untuk mengatasi kesulitan yang ditemukan dalam metode deteksi serologi, seperti rendahnya jumlah antigen, reaksi silang dari antibodi dengan antigen-entigen heterolog, dan regulasi produksi antigen yang dipengaruhi oleh tahap perkembangan tanaman dan lingkungan.

HIBRIDISASI DOT-BLOT UNTUK DETEKSI INFEKSI ToLCV

Teknik deteksi secara molekuler yang lain ialah hibridisasi asam nukleat atau *dot-blot*. Teknik ini juga sensitif untuk mendeteksi dan mengidentifikasi *Begomovirus* pada tanaman yang terinfeksi. Hibridisasi asam nukleat menggunakan sebuah membran nilon untuk mem-*blot* sap virus dan sebuah pelacak (*probe*). Teknik ini dapat digunakan untuk mendeteksi virus pada sampel yang cukup banyak dalam waktu yang sama. Namun, biasanya teknik ini mempunyai banyak tahapan yang hanya dapat dilakukan di laboratorium yang mempunyai fasilitas untuk itu.

Rodriguez *et al.* (2003) menggunakan teknik ini untuk mendeteksi infeksi *Begomovirus* pada tanaman tomat. Di

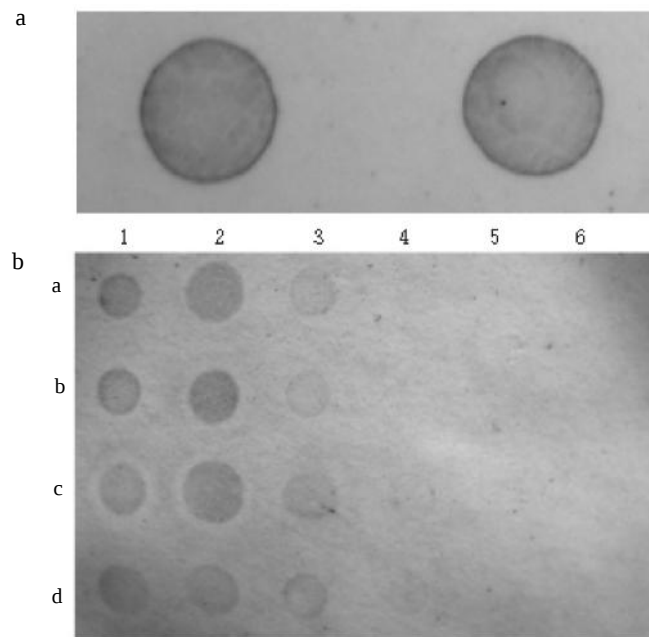
Indonesia, teknik hibridisasi *dot-blot* telah digunakan untuk mendeteksi ToLCV (Aidawati *et al.* 2007). Dengan teknik ini, virus tidak hanya terdeteksi dari ekstrak daun tomat yang bergejala, tetapi juga pada daun tomat yang tidak bergejala. Bahkan sampai pada pengenceran 100 kali dari ekstrak daun yang bergejala, virus masih dapat dideteksi. Berdasarkan intensitas warna pada membran, dapat ditentukan tingkat infeksi atau akumulasi virus pada tanaman yang terserang (Gambar 3).

PCR-RFLP UNTUK ANALISIS KERAGAMAN GENETIK BEGOMOVIRUS

Perhatian yang serius terhadap ToLCV terus meningkat seiring dengan 1) munculnya strain-strain ToLCV baru melalui rekombinasi dan pseudo-rekombinasi di antara strain dan/atau spesies virus pada berbagai tanaman, 2) peran komponen DNA- β seperti satelit virus, dan 3) ditemukannya integrasi sekuen *Begomovirus* ke dalam genom tanaman seperti pada spesies *Nicotiana* (Ribeiro *et al.* 2002). Penemuan ini mengindikasikan bahwa rekombinasi telah berkontribusi terhadap keragaman genetik *Begomovirus* dan munculnya varian dan spesies virus baru. Infeksi yang bersamaan (*mixed infection*) dari dua atau lebih *Begomovirus* pada satu tanaman juga merupakan aspek penting dalam menginduksi keragaman genetik *Begomovirus*. Hal ini karena infeksi bersamaan memberikan prakondisi terjadinya rekombinasi yang dapat memunculkan strain virus baru atau spesies *Begomovirus* baru (Sanz *et al.* 2000).

Dalam pengembangan tanaman tomat tahan virus, informasi tentang keragaman genetik virus akan bermanfaat dalam memilih lokasi untuk pengujian (uji multilokasi). Selain itu, informasi mengenai suatu strain virus yang dominan menginfeksi tanaman tomat perlu diketahui sehingga dapat diambil langkah-langkah pengendaliannya.

Beberapa peneliti telah mempelajari adanya keragaman genetik *Begomovirus*, di antaranya keragaman



Gambar 3. Deteksi ToLCV dari tanaman sakit yang dikoleksi dari Kaliurang, DI Yogyakarta menggunakan teknik hibridisasi *dot-blot*. (a) kontrol positif (klon DNA ToLCV), (b) sampel tomat cv. Safira yang diinokulasi dengan strain GVPSIm, (1a-d) = tanaman bergejala, (2a-d) = tanaman tidak bergejala, (3a-d, 4a-d, 5a-d dan 6a-d) = ekstrak daun bergejala dengan pengenceran 10 x, 100 x, 1.000 x, dan 10.000 x (Aidawati *et al.* 2007).

genetik *Begomovirus* yang menginfeksi kedelai, kacang-kacangan, dan rumput-rumputan (Rodriguez-Pardina *et al.* 2006), keragaman genetik pada infeksi campuran dari *Begomovirus* yang menginfeksi tomat, cabai, dan mentimun (Ala-Poikela *et al.* 2005), dan pada ubi kayu (Bull *et al.* 2006). Di Indonesia, Meliansyah *et al.* (2011) mempelajari keragaman genetik virus gemini yang menginfeksi rumput-rumputan, di antaranya *Ageratum conyzoides* dan *Centipeda minima*. Penggunaan teknik PCR untuk mempelajari keragaman genetik *Begomovirus* mempunyai keuntungan, antara lain hanya membutuhkan sedikit contoh DNA dan jaringan tanaman yang diduga terinfeksi virus.

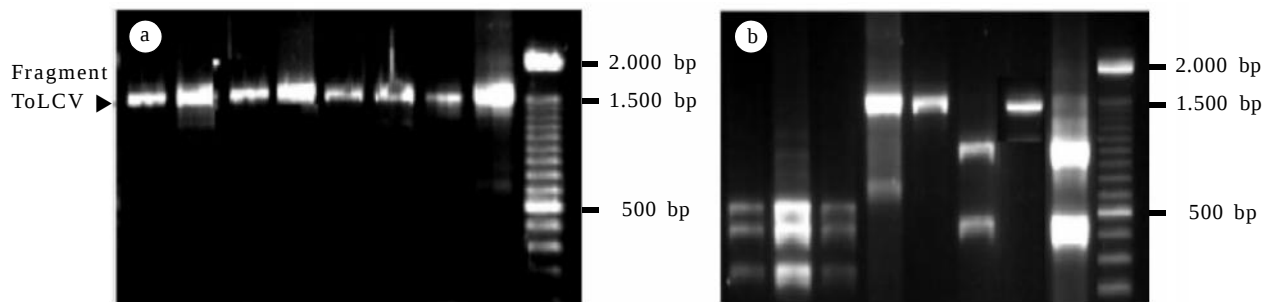
Perkembangan teknik PCR untuk mempelajari keragaman genetik ialah penggabungan teknik PCR dengan *restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) yang dapat digunakan untuk menganalisis keragaman genetik spesies *Begomovirus* yang menginfeksi tanaman. Pada teknik ini, variasi ukuran DNA hasil amplifikasi setelah dipotong dengan enzim restriksi (PCR-RFLP) digunakan sebagai dasar untuk menentukan identitas dan keragaman *Begomovirus* (Gambar 4). Teknik PCR-RFLP telah digunakan untuk melihat keragaman genetik *Begomovirus* yang menginfeksi tanaman tomat dan cabai (Aidawati *et al.* 2005; Sudiono *et al.* 2005; Santoso *et al.* 2008a). Santoso *et al.* (2008a) melaporkan adanya keragaman genetik di antara isolat-isolat *Begomovirus* yang berasal dari beberapa daerah di Jawa dan Sumatera setelah dianalisis dengan teknik PCR-RFLP. Analisis keragaman genetik menunjukkan delapan isolat

Begomovirus terbagi menjadi tiga kelompok yang berbeda. Isolat Brastagi, Bogor, Sragen, Ketep, dan Boyolali berkerabat dekat dengan *tomato leaf curl virus*-Java (ToLCV) atau ToLCV-Java (A). Isolat Malang dan Blitar berkerabat dekat dengan *Ageratum yellow vein virus*-China (AYVV-China), sedangkan isolat Kaliurang berkerabat dengan *tomato yellow leaf curl virus*-China (TYLCV-China) atau ToLCV-Laos.

SEKUENSING UNTUK ANALISIS KERAGAMAN GENETIK *BEGOMOVIRUS*

Keragaman genetik *Begomovirus* pada tingkat molekuler dapat juga diketahui dengan mempelajari urutan basa/sekuen DNA atau asam amino. Informasi berdasarkan urutan sekuen DNA atau asam amino dari bagian genom *Begomovirus* dapat diperoleh keragaman yang berkaitan dengan sekuen-sekuen fungsional atau struktural.

Di Indonesia, keragaman genetik *Begomovirus* berdasarkan sekuen DNA telah dilaporkan (Hidayat *et al.* 2008; Santoso *et al.* 2008b; Trisno *et al.* 2009). Analisis sekuen DNA pada *top region* dari *tobacco leaf curl virus* (TLCV) yang dikoleksi dari Jember (Jawa Timur) menunjukkan adanya variasi genetik dari berbagai isolat yang dianalisis (Hidayat *et al.* 2008). Hasil analisis filogenetik berdasarkan sekuen asam amino dari gen AV1-ToLCV (*coat protein*) mengindikasikan bahwa isolat



Gambar 4. Keragaman genetik *tomato leaf curl virus* (ToLCV) berdasarkan teknik PCR-RFLP; (a) fragmen hasil amplifikasi PCR DNA ToLCV menggunakan primer universal sebelum dipotong dengan enzim restriksi *EcoRI*, (b) fragmen DNA produk amplifikasi PCR dari ToLCV setelah dipotong dengan enzim restriksi *EcoRI* pada gel agarosa 1%. M=100 bp ladder; 1 = isolat Brastagi, 2 = isolat Bogor, 3 = isolat Sragen, 4 = isolat Malang, 5 = isolat Blitar, 6 = isolat Magelang, 7 = isolat Kaliurang, dan 8 = isolat Boyolali (Santoso *et al.* 2008a).

Begomovirus dari delapan daerah menunjukkan adanya keragaman genetik dan dapat terpisah menjadi dua kelompok yang berbeda (Santoso *et al.* 2008b). Sementara itu, Trisno *et al.* (2009) dengan menggunakan sekuen DNA dari *top region* memperoleh informasi adanya keragaman genetik berbagai isolat *Begomovirus* pada cabai asal Sumatera Barat.

Informasi tentang sekuen DNA atau asam amino dapat digunakan untuk menentukan identitas *Begomovirus* yang menginfeksi suatu tanaman. Isolat-isolat *Begomovirus* yang menginfeksi tomat dari Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, DI Yogyakarta, dan Sumatera Utara mempunyai identitas yang mirip dengan *Ageratum yellow vein virus* (AYVV) (Sukanto *et al.* 2005; Kon *et al.* 2006; Santoso *et al.* 2008a). Sementara itu, analisis sekuen DNA dari TLCV menunjukkan bahwa identitas TLCV mirip dengan AYVV-Zimbabwe (Hidayat *et al.* 2008). *Begomovirus* yang menginfeksi cabai di Sumatera Barat mempunyai identitas genetik yang mirip dengan *pepper yellow leaf curl* Indonesia (PYLCIV) dan *tomato yellow leaf curl* Indonesia (TYLCIV) (Trisno *et al.* 2009).

MODIFIKASI GEN UNTUK MERAKIT TANAMAN TAHAN ToLCV

Pengendalian penyakit keriting daun tomat yang disebabkan infeksi ToLCV sampai saat ini masih sulit dilakukan. Pengendalian biasanya dilakukan secara tidak langsung dengan mengurangi sumber inokulum, yaitu mencabut atau menghilangkan tanaman yang menunjukkan gejala serangan virus, mengendalikan perkembangan serangga vektor, melakukan pergiliran tanaman, dan mengendalikan gulma yang dapat menjadi inang pembawa virus. Pengendalian kutu kebul (vektor serangga) secara biologi juga telah dilakukan, namun hasilnya tidak memuaskan. Kurang efektifnya beberapa pendekatan untuk mengendalikan *Begomovirus* tersebut salah satunya karena proses penularan virus ini terjadi dengan cepat oleh vektor serangga. Sampai saat ini, belum

ada bahan kimia yang dapat diaplikasikan secara langsung untuk mengendalikan penyakit yang disebabkan oleh virus. Oleh karena itu, penggunaan varietas tahan merupakan cara yang tepat untuk mengendalikan virus karena lebih aman dan murah dibandingkan dengan metode pengendalian yang lain (Mason *et al.* 2000).

Pendekatan konvensional untuk pengembangan varietas tahan virus memiliki beberapa keterbatasan, di antaranya sumber gen ketahanan belum ditemukan pada koleksi plasma nutfah tomat di Indonesia. Selain itu, ketahanan kultivar yang dihasilkan melalui pemuliaan konvensional dengan memanfaatkan gen-gen ketahanan dari kerabat liar cepat terpatalkan oleh perubahan virus yang cepat akibat rekombinasi dan variasi genetik yang tinggi dari virus. Kultivar tahan mungkin hanya spesifik untuk strain atau isolat tertentu. Oleh karena itu, diperlukan pendekatan lain seperti pemanfaatan teknik rekayasa genetik untuk mengembangkan kultivar tomat tahan virus dengan ketahanan yang berlangsung lama.

Teknik modifikasi gen atau rekayasa genetik untuk mendapatkan sifat ketahanan terhadap virus biasanya menggunakan pendekatan konsep ketahanan yang berasal dari patogen (*pathogen-derived resistance*, PDR) yang dikembangkan oleh Sanford dan Johnson (1985). Pendekatan PDR memanfaatkan elemen genetik yang dapat berupa gen utuh atau bagian gen dari genom virus kemudian diklon dan digabungkan dengan sekuen pengendali (*promoter* dan *terminator*) lalu diintroduksi ke tanaman melalui transformasi genetik, sehingga akan memengaruhi satu atau beberapa tahap penting dalam siklus hidup virus. Pemanfaatan gen selubung protein (*coat protein gene*) merupakan contoh dari pendekatan PDR (Vidya *et al.* 2000; Raj *et al.* 2005).

Gen AV1 menyandikan protein selubung (*coat protein*) dan terletak pada utas *viral-sense* dari *Begomovirus* monopartit, termasuk *tomato (yellow) leaf curl virus*. Protein selubung mempunyai beberapa fungsi dan merupakan dasar dari metode serologi untuk deteksi dan identifikasi *Begomovirus*. Gen penyandi protein selubung (AV1) diisolasi dari virus untuk memperoleh

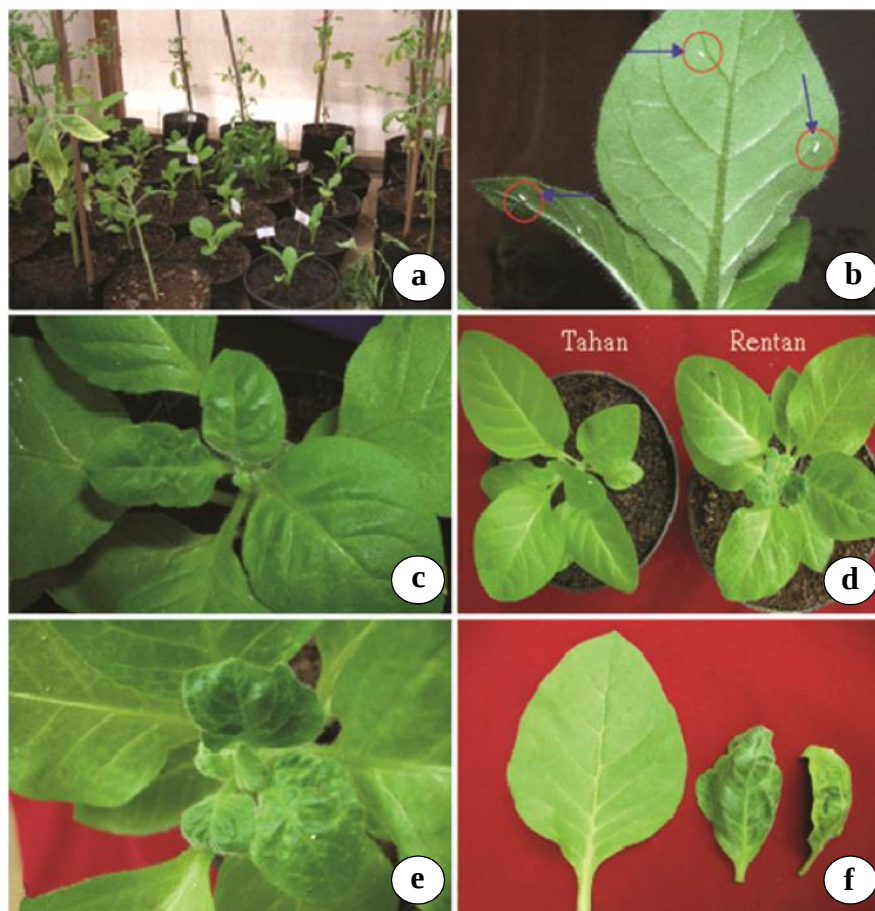
resistensi non-konvensional terhadap virus dan terbukti efektif untuk mengendalikan virus gemini pada tanaman (Raj *et al.* 2005).

Di Indonesia, modifikasi atau rekayasa genetik dari genom virus untuk mengembangkan tanaman tahan belum banyak dilaporkan. Teknik rekayasa genetik menggunakan sekuen utuh dari gen AV1-ToLCV untuk merakit konstruksi gen dan mengembangkan tanaman untuk memperoleh ketahanan terhadap *Begomovirus* telah dilakukan (Santoso *et al.* 2011; 2012). Pendekatan ini telah menghasilkan tanaman transgenik tembakau yang membawa gen AV1-ToLCV dan menunjukkan ketahanan terhadap ToLCV (Gambar 5). Penelitian yang menggunakan gen CP utuh (*full-length*) dari *Begomovirus* (TYLCV) juga telah dilakukan oleh Kunik *et al.* (1994) dan Sinisterra *et al.* (1999) untuk memperoleh ketahanan terhadap TYLCV pada tanaman tomat dan tembakau dan menghasilkan tanaman yang mengekspresikan ketahanan dari tahan sampai sangat rentan. Oleh karena itu, teknik modifikasi gen dengan memanfaatkan gen AV1-ToLCV untuk kegiatan pemuliaan melalui rekayasa genetik akan

memberikan peluang menghasilkan tanaman transgenik yang tahan terhadap infeksi *Begomovirus* dan mempunyai peran penting dalam pertanian modern pada masa mendatang.

KESIMPULAN

Aplikasi berbagai teknik molekuler, seperti PCR, PCR-RFLP, hibridisasi *dot-blot*, dan sekuensing DNA dapat membantu program pengendalian penyakit keriting yang disebabkan oleh *tomato leaf curl virus* (ToLCV). Teknik molekuler dapat mendeteksi infeksi *Begomovirus* yang berasosiasi dengan penyakit keriting daun pada tomat (ToLCV), mengidentifikasi keragaman genetik, dan mengidentifikasi homologi isolat-isolat ToLCV Indonesia. Teknik modifikasi gen (rekayasa genetik) memberikan peluang untuk memanfaatkan gen-gen dari virus dan mengembangkan tanaman yang tahan terhadap infeksi *Begomovirus*. Teknik modifikasi gen mempunyai peran penting dalam pertanian modern di masa mendatang.



Gambar 5. Tanaman tembakau transgenik yang membawa gen AV1-ToLCV yang menunjukkan ketahanan terhadap ToLCV; (a) proses penularan virus oleh kutu kebul pada kurungan kedad serangga, (b) kutu kebul yang menempel pada daun tanaman untuk menularkan virus (tanda panah), (c) gejala yang mulai muncul pada daun muda pada 2 minggu setelah inokulasi virus, (d) penampilan tanaman tembakau yang tahan dan rentan setelah inokulasi virus, (e) dan (f) gejala infeksi virus pada daun tembakau yang menyerupai kerupuk (Santoso *et al.* 2012).

DAFTAR PUSTAKA

- 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. Indones. 10: 29–32.
- Aidawati, N., S.H. Hidayat, P. Hidayat, R. Suseno, and S. Sujiprihati. 2007. Response of various tomato genotypes to *Begomovirus* infection and its improved diagnostic. Hayati 14(3): 93–97.
- Ala-Poikela, M., E. Svensson, A. Rojas, T. Horko, L. Paulin, J.P.T. Valkonen, and A. Kvarnheden. 2005. Genetic diversity and mixed infection of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. Plant Phytol. 54: 448–459.
- Ambrosevicius, L.P., R.F. Calegario, E.P.B. Fontes, M.G. Carvalho, and F.M. Zerbini. 2002. Genetic diversity of *Begomovirus* infecting tomato and associated weed in South-eastern Brazil. Fitopatologia Brasileira 27: 372–377.
- AVRDC. 2003. Centerpoint newsletter-spring 2003 issue. 21(1): 1.
- Azza, G.F., M.A. Amer, H.A. Amin, and H.M. Mayzad. 2005. Detection of bipartite geminiviruses causing squash leaf curl disease in Egypt using polymerase chain reaction and nucleotide sequence. Egypt. J. Virol. 2: 239–354.
- Briddon, R.W., J. Watts, P.G. Markham, and J. Stanley. 1989. The coat protein of beet curly top virus is essential for infectivity. Virology 172: 628–633.
- Brown, J.K. and H. Czosnek. 2002. Whitefly transmission of plant viruses. Adv. Bot. Res. 36: 65–100.
- Bull, S.E., R.W. Briddon, W.S. Serubombwe, K. Ngugi, P.G. Markham, and J. Stanley. 2006. Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic viruses in Kenya. J. Gen. Virol. 87: 3053–3065.
- Hidayat, S.H., O. Chatchawankanpanich, and N. Aidawati. 2008. Molecular identification and sequence analysis of *tobacco leaf curl begomovirus* from Jember, East Java, Indonesia. Hayati 15(1): 13–17.
- Kon, T., S.H. Hidayat, S. Hase, H. Takahashi, and M. Ikegami. 2006. The natural occurrence of two distinct begomoviruses associated with DNA β and a recombinant DNA in a tomato plant. Phytopathology 96: 517–525.
- Kunik, T., R. Salomon, D. Zamair, M. Zeidan, I. Michelson, Y. Gafni, and H. Czosnek. 1994. Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus. Bio/Tech 12: 500–504.
- Mason, G., M. Rancati, and D. Bosco. 2000. The effect of thiamethoxam, a second generation neonicotinoid insecticide, in preventing transmission of *tomato yellow leaf curl geminivirus* (TYLCV) by the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius). Crop Prot. J. 19: 473–479.
- Meliansyah, R., S.H. Hidayat, and K.H. Mutaqin. 2011. Geminiviruses associated with the weed species *Ageratum conyzoides*, *Centipeda minima*, *Porophyllum ruderale*, and *Spilanthes iabadicencis* from Java, Indonesia. Mikrobiologi 5(3): 120–124.
- Moriones, E. and J. NavasCatillo. 2000. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. Virus Res. 71: 123–134.
- Mudmainah, S. dan Purwanto. 2010. Deteksi *Begomovirus* pada tanaman cabai merah dengan I-ELISA test dan teknik PCR. Agrosains 12(2): 44–49.
- Pico, B., M.J. Diez, and F. Nuez. 1999. Improved diagnostic techniques for *tomato yellow leaf curl virus* in tomato breeding programs. Plant Dis. 83: 1006–1012.
- Raj, S.K., R. Singh, S.K. Pandey, and B.P. Singh. 2005. *Agrobacterium-mediated* tomato transformation and regeneration of transgenic lines expressing *tomato leaf curl virus* coat protein gene for resistance against TLCV infection. Curr. Sci. 88(10): 1674–1679.
- Rampersad, S.N. and P. Umaharan. 2003. Detection of two bipartite geminiviruses infecting dicotyledonous weeds in Trinidad. Plant Dis. 87: 602.
- Ribeiro, S.G., C. Lacorte, A.K. Inoue-Nagata, I. Carmo, D. Orlandini, T. Nagata, and F.M. Zerbini. 2002. Tomato chlorotic mottle virus, a novel tomato *Begomovirus* from Brazil. Fitopatologia Brasileira 27: 5211 [Abstract].
- Rodriguez, R., P.L. Ramos, V. Doreste, K. Velazquez, R. Peral, A. Fuentes, and M. Pujol. 2003. Establishment of a non-radioactive nucleic acid hybridization technique for *Begomovirus* detection. Biotechnol. Aplicada 20: 164–169.
- Rodriguez-Pardina, P.E., F.M. Zerbini, and D.A. Ducasse. 2006. Genetic diversity of *Begomovirus* infecting soybean, bean and associated weeds in Mortwestern Argentina. Fitopatologia Brasileira 31: 342–348.
- Rusli, E.S. 2000. Deteksi dan karakterisasi virus gemini asal cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.). Tesis. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 42 hlm.
- Sanford, J.C. and S.A. Johnson. 1985. The concept of parasite-derived resistance: deriving resistance genes from the parasites own genome. J. Theor. Biol. 115: 395–405.
- Santoso, T.J. 2008. Identifikasi *Begomovirus* Indonesia dan analisis diversitas genetik gen AV1 serta pemanfaatannya untuk pengembangan tanaman tahan virus. Disertasi. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 156 hlm.
- Santoso, T.J., S.H. Hidayat, H. Aswidinnoor, M. Herman, dan Sudarsono. 2008a. Identitas dan keragaman genetik *Begomovirus* yang berasosiasi dengan penyakit keriting pada tomat berdasarkan teknik PCR-RFLP. AgroBiogen 4(1): 9–17.
- Santoso, T.J., S.H. Hidayat, A.S. Duriat, M. Herman, and Sudarsono. 2008b. Identity and sequence diversity of *Begomovirus* associated with yellow leaf curl disease of tomato in Indonesia. Microbiol. Indones. 2(1): 1–7.
- Santoso, T.J., M. Herman, S.H. Hidayat, H. Aswidinnoor, dan Sudarsono. 2011. Konstruksi kandidat gen AV1 *Begomovirus* pada pBI121 dan introduksinya ke dalam tembakau menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens*. J. AgroBiogen 7(1): 9–18.
- Santoso, T.J., M. Herman, S.H. Hidayat, H. Aswidinnoor, and Sudarsono. 2012. Molecular analysis and effectiveness assay of AV1 gene in transgenic tobacco for resistance to *Begomovirus*. J. Agrobiogen 8(2): 45–53.
- Sanz, A.I., A. Fraile, E. Garcia-Arenal, X. Zhou, D.J. Robinson, S. Khalid, T. Butt, and B.D. Horison. 2000. Multiple infection, recombination and genome relationship among *Begomovirus* isolates found in cotton and other plants in Pakistan. J. Gen. Virol. 81: 1839–1849.
- Sinisterra, X.H., J.E. Polston, A.M. Abourized, and E. Hiebert. 1999. Tobacco plants transformed with a modified coat protein of tomato mottle *Begomovirus* show resistance to virus infection. Phytopathology 89: 701–706.
- Sudiono, S.H. Hidayat, R. Suseno, dan S. Sosromarsono. 2004. Penggunaan teknik PCR dan RFLP untuk deteksi dan analisis keragaman virus gemini pada tanaman tomat yang berasal dari

- berbagai daerah di Jawa Barat dan Lampung. J. HPT Tropika. 4(2): 89–93.
- Sudiono, N. Yasin, S.H. Hidayat, dan P. Hidayat. 2005. Penyebaran dan deteksi molekuler virus gemini penyebab penyakit kuning pada tanaman cabai di Sumatera. J. HPT Tropika 5(2): 113–121.
- Sukamto, T. Kon, S.H. Hidayat, K. Ito, S. Hase, H. Takahashi H, and M. Ikegami. 2005. *Begomovirus* associated with leaf curl disease of tomato in Java, Indones. J. Phytopathol. 153: 562–566.
- Sulandari, S., R. Suseno, S.H. Hidayat, J. Harjosudarmo, dan S. Sosromarsono. 2006. Deteksi dan kajian kisaran inang virus penyebab penyakit daun keriting kuning cabai. Hayati 13(1): 1–6.
- Trisno, J., S.H. Hidayat, T. Habazar, I. Manti, and Jamsari. 2009. Detection and sequence diversity of *Begomovirus* associated with yellow leaf curl disease of pepper (*Capsicum annuum*) in West Sumatra, Indonesia. Microbiology 3(2): 56–61.
- Van Regenmortel, M.H.V., C.M. Fauquet, D.H.L Bishop, E. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, and R.B. Wickner. 1999. Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego.
- Vidya, C.S.S., M. Manoharan, C.T.R. Kumar, H.S. Savithri, and G.L. Sita. 2000. Agrobacterium-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* var. Pusa Ruby) with coat protein gene of Physalis mottle tymovirus. Plant Physiol. 156: 106–110.
- Zeidan, M., S.K. Green, D.P. Maxwell, M.K. Nakhla, and H. Czosnek. 1998. Molecular analysis of whitefly-transmitted tomato geminiviruses from Southeast and East Asia. Trop. Agric. Res. Ext. 1(2): 107–115.
- Zhou, X., Y. Xie, X. Tao, Z. Zhang, Z. Li, and C.M. Fauquet. 2003. Characterization of DNA β associated with begomoviruses in China and evidence for co-evolution with their cognate viral DNA-A. J. Gen. Virol. 84: 237–247.