

Keragaman Virulensi dan Konstruksi Molekuler Virus Tungro pada Padi dari Daerah Endemis

R. Heru Praptana¹, YB. Sumardiyono², Sedyo Hartono², Y. Andi Trisyono² dan I. Nyoman Widiarta³

¹Loka Penelitian Penyakit Tungro
Jl. Bulu No. 101 Lanrang, Rappang Sidrap Sulawesi Selatan
Email: herujuly@yahoo.com

²Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada
Jl Bulaksumur, Yogyakarta

³Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan
Jl. Merdeka No. 147 Bogor

Naskah diterima 6 Mei 2014 dan disetujui diterbitkan 22 Juli 2014

ABSTRACT. Virulence Diversity and Molecular Construction of Rice Tungro Viruses, Obtained from Endemic Areas. Tungro is an important disease of rice, constraining to the rice production in Indonesia. Tungro is caused by the infection of two different viruses namely tungro bacilliform virus (RTBV) and tungro spherical virus (RTSV). Both viruses are only transmitted by green leafhoppers, especially *Nephotettix virescens* in a semipersistent manner. The variation of tungro viruses from different areas had been reported, and there is a specific relationship between resistance variety and tungro virus isolate. It is important therefore, to study the virulences and the genetic diversities of tungro viruses derived from the endemic areas in Indonesia. This study was aimed to identify the virulence and the molecular diversity of tungro viruses from endemic areas in Indonesia. Susceptible variety TN1 was used in the study. Surveys and collection of the infected plants and green leafhoppers were conducted in some tungro endemic areas, including: West Java, Central Java, Yogyakarta, Central Sulawesi, West Sulawesi, South Sulawesi, Bali and West Nusa Tenggara. Artificial virus transmission using test tube method was used in the virulence test. Green leafhoppers caught from the field were used as vector transmitters. The virulence of tungro viruses was determined based on diseases indexes (DI). Results showed that the virulence of tungro viruses varied among region in the endemic areas in Indonesia. The Central Java virus isolate was the most virulence; however, not all isolates from endemic areas in the island of Java were more virulent than those from outside of Java. The presence of RTBV and RTSV was detected in the infected TN1 plants. The existences of molecular diversities of tungro viruses from the endemic areas were observed. The relationship between combination of DNA bands of RTBV and RTSV with the virulence in endemic areas outside of Java was more complex than it was in West Java and Central Java. The molecular diversities of tungro viruses were not correlated with the geographic difference of the endemic areas, nor with the virulences.

Keywords: Rice, tungro, RTBV, RTSV, resistant varieties, virulence, molecular diversity.

ABSTRAK. Tungro merupakan salah satu penyakit penting pada padi yang menjadi kendala dalam peningkatan produksi padi di Indonesia. Tungro disebabkan oleh infeksi dua virus yang berbeda yaitu *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV) dan *Rice tungro spherical virus* (RTSV), yang keduanya hanya dapat ditularkan oleh vektor terutama *Nephotettix virescens* (Distant) secara semipersisten. Adanya indikasi bahwa terjadi variasi virulensi virus tungro dari daerah yang berbeda dan hubungan spesifik antara ketahanan varietas dengan isolat virus tungro maka diperlukan suatu

kajian tentang virulensi dan keragaman genetik virus tungro dari beberapa daerah endemis di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mendeterminasi keragaman virulensi dan molekuler virus tungro dari beberapa daerah endemis di Indonesia. Varietas rentan TN1 digunakan di dalam penelitian. Survei dan koleksi tanaman terinfeksi dilakukan di beberapa daerah endemis tungro yaitu Jabar, Jateng, DIY, Sulteng, Sulbar, Sulsel, Bali dan NTB. Penularan buatan dengan metode tabung digunakan dalam uji virulensi virus tungro. Vektor hasil tangkapan dari lapangan digunakan sebagai penular. Virulensi virus tungro ditentukan berdasarkan nilai indeks penyakit (DI). Hasil penelitian menunjukkan bahwa virulensi virus tungro bervariasi di antara daerah endemis. Isolat Jateng merupakan isolat paling virulen dan tidak semua isolat dari daerah endemis di pulau Jawa lebih virulen dibanding isolat dari luar Jawa. Keberadaan RTBV dan RTSV terdeteksi dalam setiap sampel tanaman TN1 bergejala hasil penularan. Virus tungro dari beberapa daerah endemis di Indonesia teridentifikasi beragam pada tingkat molekuler. Hubungan antara kombinasi pita DNA RTSV dan RTBV dengan virulensi virus tungro di daerah endemis di luar Jawa lebih kompleks dibandingkan dengan di Jabar dan Jateng. Keragaman molekuler virus tungro tidak berkorespondensi dengan perbedaan geografi daerah endemis dan virulensi.

Kata kunci: Padi, tungro, RTBV, RTSV, varietas tahan, virulensi, keragaman molekuler.

Tungro merupakan salah satu penyakit penting padi yang menjadi masalah dalam peningkatan produksi padi nasional. Tungro disebabkan oleh infeksi dua virus yang berbeda yaitu *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV) dan *Rice tungro spherical virus* (RTSV), yang keduanya hanya dapat ditularkan oleh wereng hijau (vektor) terutama *Nephotettix virescens* (Distant) secara semipersisten. Penyebaran tungro tidak hanya di Indonesia tetapi juga terjadi di India (Muralidharan *et al.* 2003), Malaysia, Filipina (Cabunagan *et al.* 2003), Thailand (Tangkananond *et al.* 2005), dan Vietnam (Du *et al.* 2005; Du *et al.* 2007). Di Indonesia, rerata luasan serangan tungro dalam kurun waktu tahun 2001 - 2006 mencapai 3650 ha per tahun. Pada musim tanam (MT) 2010/2011 terjadi serangan seluas 5828 ha dan meningkat menjadi 7177 ha pada MT 2011 yang tersebar di 33 provinsi (Kusprayogie *et al.* 2011).

Tiga komponen utama dalam pengendalian tungro adalah: 1) penggunaan varietas tahan dan tanam serempak; 2) eradikasi sumber inokulum dan 3) keputusan dalam pemilihan varietas dan pengaturan waktu tanam. Ketiganya dipadukan dengan pengelolaan lingkungan dan penggunaan insektisida (Savary *et al.* 2012). Penggunaan varietas tahan virus tungro dan vektor merupakan komponen yang efektif dalam pengendalian tungro dan sesuai untuk berbagai ekosistem di Indonesia. Penggunaan varietas tahan sangat ramah lingkungan serta sesuai dan mudah diterima oleh petani karena tidak memerlukan biaya tambahan (Khoury and Makkouk 2010). Suatu varietas tahan tidak dianjurkan untuk ditanam secara terus-menerus karena dapat meningkatkan tekanan seleksi vektor dan memungkinkan terbentuknya biotipe vektor baru. Keseragaman varietas tahan yang ditanam di suatu wilayah juga akan mempermudah vektor untuk beradaptasi dan mempercepat terjadinya mutasi virus tungro, sehingga ketahanan varietas tidak dapat berlangsung lama. Ketahanan varietas juga bersifat spesifik lokasi, berarti bahwa suatu varietas menunjukkan reaksi tahan terhadap isolat virus tungro di daerah tertentu tetapi belum tentu tahan terhadap isolat virus tungro di daerah lain. Hal tersebut mengindikasikan adanya variasi virulensi virus tungro dari berbagai daerah yang berbeda.

Kejadian tungro sering ditemukan pada varietas yang sama di beberapa daerah yang secara geografi berbeda, varietas tersebut tidak memiliki gen ketahanan terhadap virus tungro maupun terhadap vektor. Beberapa varietas tahan yang telah dilepas tidak semuanya dapat dikembangkan di seluruh daerah endemis dan umumnya kurang disukai oleh petani (Praptana dan Muliadi 2013). Pengendalian tungro menggunakan varietas tahan harus disesuaikan dengan variasi virulensi virus tungro, sehingga diperlukan ketersediaan dan pemetaan dalam distribusi varietas tahan. Perbedaan strain virus tungro merupakan salah satu faktor yang menyebabkan adanya variasi keparahan gejala tungro (Choi *et al.* 2009). Di antara daerah endemis tungro, ada kemungkinan terdapat variasi genetik virus tungro yang berpengaruh terhadap terjadinya perbedaan patogenisitas antar isolat, sehingga diperlukan beberapa varietas tahan dengan latar belakang genetik yang berbeda untuk menjaga durabilitas ketahanannya (Azzam and Cancellor 2002).

Analisis molekuler berbasis PCR terhadap beberapa isolat RTBV dari daerah endemis yang berbeda di India menunjukkan adanya keragaman molekuler antar isolat (Joshi *et al.* 2003; Mangrauthia *et al.* 2012a; Banerjee *et al.* 2012), dan isolat RTBV di India tergabung dalam kelompok yang terpisah jauh dengan isolat dari Thailand, Malaysia dan Filipina (Sharma *et al.* 2011). Isolat RTBV baru dari Chinsura mempunyai kedekatan genetik

dengan kelompok isolat RTBV asal Asia Selatan dan berkerabat jauh dengan kelompok isolat RTBV asal Asia Tenggara (Banerjee *et al.* 2011). Keragaman genetik RTSV di India terbagi menjadi dua kelompok (Mangrauthia *et al.* 2012b), dan kekerabatan dua isolat RTSV dari daerah yang berbeda di India berhubungan erat dengan strain RTSV-Vt6 dari Filipina (Verma and Dasgupta 2007). Keragaman molekuler dan sebaran berdasarkan perbedaan geografi pada RTSV tidak berkorelasi dengan yang terjadi pada RTBV karena tingkat variasi nukleotida yang tinggi pada genom RNA (Druka and Hull 2010).

Informasi variasi virulensi dan keragaman genetik virus tungro dari berbagai daerah endemis di Indonesia sangat diperlukan untuk mengetahui sebaran virus tungro berdasarkan virulensinya, sebagai pertimbangan dalam pengendalian tungro menggunakan varietas tahan yang sesuai serta menjadi dasar dalam perakitan varietas tahan tungro baik secara konvensional maupun melalui teknik rekayasa genetik. Perakitan dan perbaikan varietas tahan spesifik isolat virus tungro serta pergiliran varietas tahan membutuhkan informasi tentang keragaman molekuler dan virulensi isolat virus tungro serta keragaman gen ketahanan terhadap virus tungro. Informasi keragaman molekuler virus tungro diperlukan untuk merancang strategi pengendalian melalui rekayasa genetik seperti penerapan konsep *pathogen-derived resistance* (Zhang *et al.* 2009), antara lain coat protein mediated resistance (Ganesan *et al.* 2009), RNA interference-mediated resistance (Tyagi *et al.* 2008; Verma *et al.* 2012), dan *virus-induced gene silencing* (VIGS) (Purkayastha *et al.* 2010).

Keragaman dan kekerabatan molekuler isolat RTBV dan RTSV di berbagai daerah endemis merupakan informasi yang sangat penting untuk menentukan strategi pengendalian kaitannya dengan penggunaan varietas tahan (Sharma *et al.* 2011). Pemahaman bagaimana beberapa isolat virus tungro dapat menginfeksi varietas tahan tertentu dan identifikasi gen ketahanan beberapa tetua merupakan langkah strategis dalam pengembangan dan pengelolaan durabilitas ketahanan varietas tahan (Dai and Beachy 2009). Tujuan penelitian ini adalah mendeterminasi variasi virulensi dan konstruksi molekuler virus tungro dari beberapa daerah endemis di Indonesia.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan sejak bulan April 2009 sampai Oktober 2010 di rumah kaca Loka Penelitian Penyakit Tungro, Lanrang, Sulawesi Selatan, Laboratorium Virologi, Laboratorium Bioteknologi, dan Laboratorium Genetika Fakultas Pertanian UGM Yogyakarta. Kegiatan penelitian terdiri atas: 1) Uji keragaman virulensi virus tungro dan 2) Uji keragaman molekuler virus tungro.

Uji Keragaman Virulensi Virus Tungro

Benih varietas rentan terhadap virus tungro dan vektor (TN1) disemai dalam pot, kemudian dimasukkan ke dalam kurungan kasa dan dipelihara di rumah kaca. Setelah berumur 21 hari, bibit dibawa ke daerah endemis untuk diinokulasi virus tungro di lapangan dan sebagian bibit dipelihara di rumah kaca yang dipersiapkan untuk kontrol (tanpa inokulasi).

Isolat virus tungro (rumpun tanaman bergejala tungro) dan koloni vektor berasal dari delapan daerah endemis di Indonesia yaitu Subang (Jawa Barat), Magelang (Jawa Tengah), Sleman (Daerah Istimewa Yogyakarta), Tabanan (Bali), Lombok Tengah (Nusa Tenggara Barat), Sidrap (Sulawesi Selatan), Polewali Mandar (Sulawesi Barat) dan Donggala (Sulawesi Tengah). Di setiap daerah endemis ditentukan empat lokasi pengambilan sampel untuk penularan dengan jarak antarlokasi kurang lebih 200 m.

Uji virulensi virus tungro dilakukan dengan penularan buatan terhadap bibit padi di dalam tabung gelas (*test tube method*) menggunakan vektor dan sumber inokulum dari pertanaman tertular di setiap daerah endemis. Vektor hasil tangkapan dari pertanaman tertular, satu per satu dimasukkan ke dalam kurungan yang sebelumnya telah diisi dengan rumpun tanaman terinfeksi (bergejala tungro) yang diperoleh dari pertanaman tertular. Setelah kurang lebih 5 jam, vektor diinfestasikan pada bibit di dalam tabung gelas yang telah diisi air setinggi 1 cm masing-masing dua ekor imago. Penularan dilakukan terhadap 10 bibit di setiap lokasi (10 tabung per lokasi). Setelah 24 jam penularan di dalam tabung reaksi, bibit ditanam pada pot kemudian dimasukkan ke dalam kurungan kasa dan dipelihara di dalam rumah kaca. Sepuluh bibit TN1 ditanam dalam pot kemudian dimasukkan ke dalam kurungan kasa sebagai pembandingan (tanpa inokulasi virus tungro).

Pengamatan dilakukan terhadap insidensi tungro, tingkat keparahan gejala tungro, dan tinggi tanaman pada saat berumur 3 minggu setelah tanam (MST). Insidensi tungro ditentukan dengan menghitung jumlah tanaman bergejala tungro dibagi dengan jumlah tanaman yang diamati, kemudian dikalikan 100%. Tingkat keparahan gejala tungro dievaluasi berdasarkan sistem skor sesuai dengan *Standard Evaluation System for Rice* (SESIR) IIRRI sebagai berikut:

Skor 1 = tidak ada gejala serangan

3 = tinggi tanaman lebih pendek 1-10%, perubahan warna daun dari kuning ke kuning oranye tidak nyata

5 = tinggi tanaman lebih pendek 11-30%, perubahan warna daun dari kuning ke kuning oranye tidak nyata

7 = tinggi tanaman lebih pendek 31-50%, perubahan warna daun dari kuning ke kuning oranye nyata

9 = tinggi tanaman lebih pendek >50%, perubahan warna daun dari kuning ke kuning oranye nyata

Berdasarkan skor tingkat keparahan gejala tersebut kemudian dihitung indeks penyakit dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$DI = \frac{n(1) + n(3) + n(5) + n(7) + n(9)}{tn}$$

DI : *Disease Index* (indeks penyakit)

n : Jumlah tanaman yang menunjukkan nilai skor tertentu

tn : Total tanaman yang diskor

Tingkat keparahan gejala tungro ditentukan berdasarkan nilai DI, yang berarti bahwa semakin tinggi nilai DI maka gejala yang ditimbulkan semakin parah dan sebaliknya. Virulensi virus tungro ditentukan berdasarkan tingkat keparahan gejala, yang berarti bahwa semakin tinggi nilai DI maka tingkat virulensi virus tersebut semakin tinggi dan sebaliknya.

Uji Keragaman Molekuler Virus Tungro

Daun ke tiga dari tanaman TN1 bergejala dari hasil inokulasi isolat virus tungro yang berasal dari setiap daerah digunakan sebagai sampel untuk isolasi DNA dan RNA. Sampel daun diambil pada tiga minggu setelah inokulasi. Sebanyak masing-masing 0,1 gr dari setiap sampel daun digunakan untuk ekstraksi DNA dan RNA.

Ekstraksi DNA ditujukan untuk memperoleh DNA RTBV yang dilakukan dengan metode CTAB (Padmalatha and Prasad 2006), dengan sedikit dimodifikasi, yaitu volume buffer CTAB yang digunakan dan tanpa penggunaan RNase. Ekstraksi RNA ditujukan untuk memperoleh ssRNA RTSV. Ekstraksi RNA dilakukan menggunakan *Isogen RNA Extraction Kit* (Amersham Pharmacia) dengan sedikit modifikasi, yaitu tanpa penggunaan nitrogen cair dan peningkatan kecepatan dalam sentrifugasi.

Analisis RT-PCR dilakukan untuk membentuk *complementary-DNA* (cDNA) dari RTSV. Sebelum dilakukan analisis PCR untuk RTSV, RNA hasil ekstraksi diubah dahulu menjadi cDNA menggunakan *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas). Primer yang digunakan untuk pembentukan cDNA adalah oligo d(T) karena genom RTSV mempunyai poly (A) pada ujung 3'. Analisis RT-PCR dilakukan sesuai dengan buku panduan (*manual*).

Tabel 1. Volume reaksi dan program PCR untuk deteksi RTBV dan RTSV.

Komposisi	Volume (μ l)	Program PCR	Suhu ($^{\circ}$ C)	Waktu (menit)	Jumlah siklus
RTBV					
MMB	16	Predenaturasi	94	5'	1
Primer F	1	Denaturasi	94	50"	35
Primer R	1	Annealing	55	30"	35
DNA	1	Ekstensi	72	1'	35
Total	19	Siklus akhir	72	5'	1
		Stop	4	~	-
RTSV					
PCR Bead	20	Predenaturasi	94	5'	1
Primer F	1	Denaturasi	94	50"	35
Primer R	1	Annealing	53	1'	35
cDNA	1	Ekstensi	72	50"	35
Total	23	Siklus akhir	72	5'	1
		Stop	4	~	-

Konsentrasi masing-masing primer yang digunakan adalah 10 pmol; PCR Bead = *pureTaq Ready to Go PCR Bead*; ' = menit; " = detik

Analisis PCR dilakukan untuk mendeteksi keberadaan virus tungro pada tanaman hasil penularan. Reagen yang digunakan dalam analisis PCR untuk deteksi RTBV adalah *Mega Mix Blue* (MMB) (Microzone Limited). *PureTaq Ready to Go PCR Bead* (GE Healthcare) digunakan untuk deteksi keberadaan RTSV. Primer GCAGAACAGAAGCTCTAAGGC (F) dan GTCTAAGGCTCATGCTGGAT (R) digunakan untuk mendeteksi RTBV dengan target amplifikasi sekuen ORF2 yang berukuran sekitar 430 bp. Primer AAACGGTCATTGTGGGGAGGT (F) dan CAGGCCAGCAACGACATAA (R) digunakan untuk deteksi RTSV dengan target amplifikasi sekuen CP1-CP2 yang berukuran sekitar 1115 bp.

Analisis PCR-RFLP dilakukan untuk mengetahui keragaman molekuler virus tungro berdasarkan keberadaan dan posisi *restriction site* pada sekuen DNA hasil PCR. Enzim restriksi *DraI* digunakan untuk analisis DNA RTBV, sedangkan enzim *BstYI* dan *HindIII* digunakan untuk analisis DNA RTSV. Analisis PCR-RFLP dilakukan mengikuti metode Vink (2012). Penentuan enzim restriksi didasarkan pada analisis restriksi terhadap sekuen RTBV dan RTSV yang ada di Gen Bank *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) menggunakan program Genetyx 7.0. Hasil analisis PCR dan PCR-RFLP dielektroforesis pada PAGE bersama 1 kb DNA ladder dan divisualisasi pada *UV transilluminator*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keragaman Virulensi Virus Tungro

Tanaman varietas TN1 memberikan respons gejala yang berbeda setelah diinokulasi dengan isolat virus tungro

dari beberapa daerah endemis. Gejala serangan yang ditimbulkan bervariasi dari daun yang berwarna hijau kekuningan hingga kuning serta tingkat kekerdilan yang berbeda dari agak kerdil hingga kerdil. Gejala serangan pada tanaman terinfeksi terlihat jelas berbeda dengan tanaman kontrol terutama perbedaan tinggi tanaman. Hal tersebut menunjukkan bahwa vektor hasil tangkapan di pertanaman telah memperoleh kedua virus tungro dan berhasil menularkannya pada tanaman TN1. Vektor dapat memperoleh dan menularkan kedua virus tungro secara bersama-sama atau RTSV saja dan tidak dapat memperoleh dan menularkan RTBV jika tidak memperoleh RTSV sebelumnya (Choi *et al.* 2009).

Rata-rata insidensi tungro hasil penularan dari setiap isolat virus tungro berkisar antara 70-100% (Tabel 2). Seluruh tanaman TN1 yang diinokulasi dengan isolat Jateng, Sulteng, Sulsel dan Bali menunjukkan gejala tungro, namun terjadi variasi penurunan tinggi dan nilai DI. Jika dibandingkan dengan kontrol, penurunan tinggi akibat infeksi virus tungro berkisar antara 35-57%. Isolat Jateng dan Sulteng menyebabkan penurunan tinggi lebih dari 50% sehingga tanaman terlihat lebih kerdil dibandingkan dengan tanaman yang diinokulasi dengan isolat lainnya. Indeks penyakit tungro berkisar antara 6-9 dan tertinggi terjadi pada isolat Jateng. Berbeda dengan isolat Jateng, Sulteng, Sulsel dan Bali, isolat DIY dan Sulsel menyebabkan penurunan tinggi dan DI yang sama tetapi insidensi tungro berbeda. Hal tersebut mengindikasikan bahwa setiap isolat memiliki kemampuan menginfeksi yang berbeda.

Setiap isolat virus tungro menunjukkan virulensi yang berbeda walaupun berasal dari sumber inokulum (varietas padi yang terinfeksi di setiap daerah endemis) yang sama. Isolat Jateng dan Sulteng menyebabkan gejala

Tabel 2. Respons tanaman TN1 setelah diinokulasi dengan isolat virus tungro dari beberapa daerah endemis.

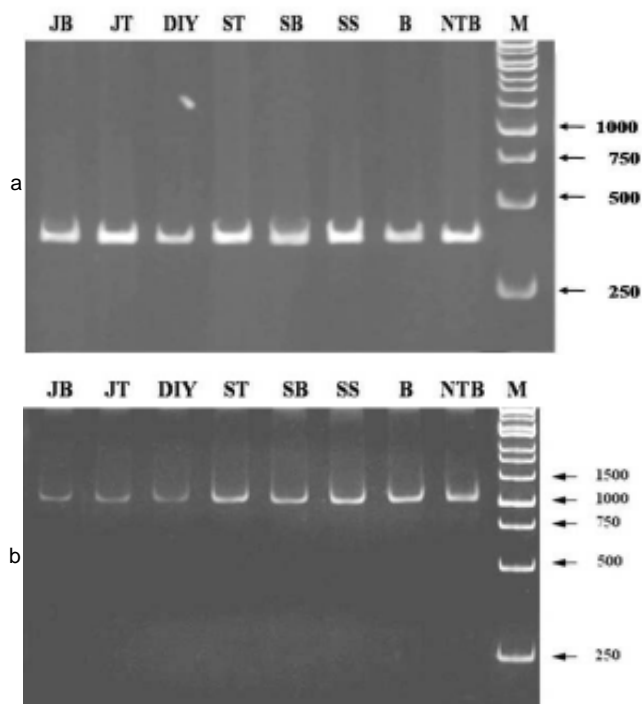
Isolat	Insidensi tungro (%)	Tinggi tanaman (cm)	Indeks penyakit (DI)	Gejala
Jabar	90	17	7,15	ak, kh
Jateng	100	13	9,00	k, kn
DIY	70	19	6,35	ak, kh
Sulteng	100	14	7,85	k, kn
Sulbar	70	16	7,35	ak, kh
Sulsel	100	19	6,35	ak, kh
Bali	100	16	7,00	ak, kh
NTB	90	18	6,85	ak, kh
Kontrol	0	29	1,00	h

k = kerdil; ak = agak kerdil; kh = hijau kekuningan; kn = kuning; h = hijau

paling parah hingga tanaman menjadi kerdil dan berwarna kuning. Isolat dari daerah endemis yang lain menyebabkan tanaman menjadi agak kerdil dan variasi perubahan warna daun. Perbedaan tingkat keparahan gejala tersebut mengindikasikan adanya variasi virulensi virus tungro dari daerah endemis yang berbeda. Berdasarkan nilai DI, isolat Jateng merupakan isolat yang paling virulen, sedangkan isolat DIY dan Sulsel lebih rendah virulensinya dibandingkan dengan isolat yang lain.

Keragaman Molekuler Virus Tungro

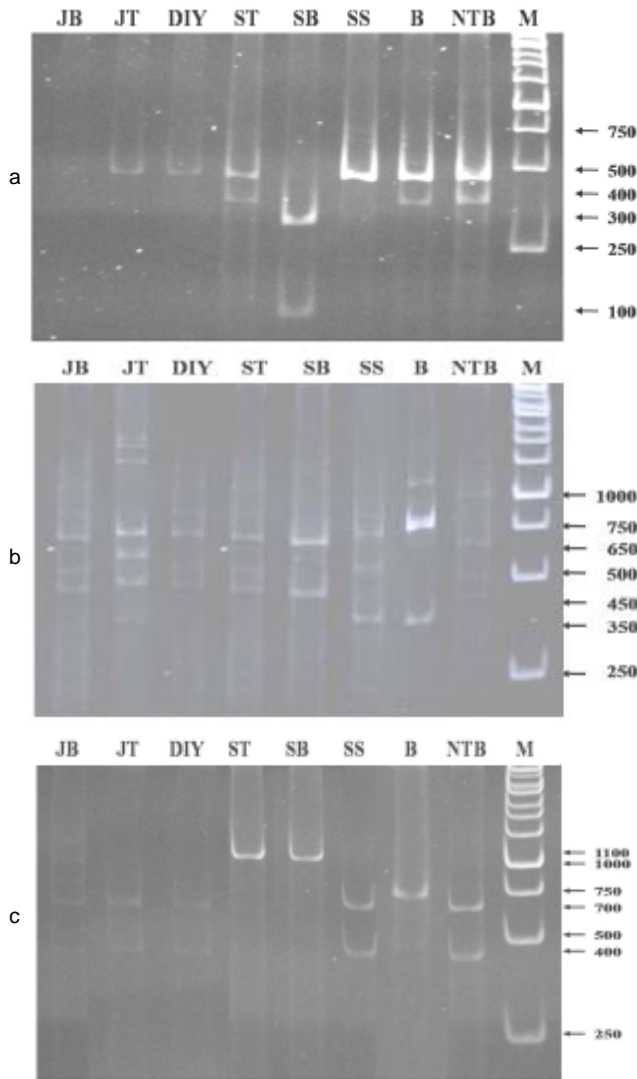
Keberadaan virus tungro pada setiap sampel tanaman varietas TN1 bergejala tungro hasil penularan terdeteksi melalui analisis PCR yang ditunjukkan oleh adanya satu pita DNA dengan ukuran yang sesuai dengan target amplifikasi dari setiap primer. Keberadaan RTBV ditunjukkan oleh satu pita DNA berukuran sekitar 430 bp yang konsisten teramplifikasi pada semua sampel (Gambar 1a). Berdasarkan sekuen lengkap RTBV di *DNA Data Bank of Japan* (DDBJ) nomor asesi M65026, target amplifikasi primer RTBV adalah sekuen basa nukleotida antara 576-1006 (bagian dari ORF 2). Demikian juga dengan RTSV yang ditunjukkan dengan adanya satu pita DNA berukuran sekitar 1115 bp yang konsisten teramplifikasi pada semua sampel (Gambar 1b). Berdasarkan sekuen lengkap RTSV di DDBJ nomor asesi M95497, target amplifikasi primer RTSV adalah sekuen basa nukleotida antara 2494-3608 yang merupakan bagian dari CP1-CP2. Keberhasilan dalam deteksi kedua virus tungro di dalam setiap sampel tanaman TN1 hasil penularan menunjukkan bahwa infeksi kedua virus tungro telah terjadi pada pertanaman di lapangan dan tanaman TN1 hasil penularan telah terinfeksi kedua virus tungro yang ditularkan oleh vektor hasil tangkapan dari lapangan.



Gambar 1. Elektroforesis hasil analisis PCR beberapa isolat virus tungro pada PAGE: a) Pita DNA RTBV sebesar 430 bp hasil analisis PCR dengan primer RTBV; b) Pita DNA RTSV sebesar 1115 bp hasil analisis PCR dengan primer RTSV; JB = Jabar; JT = Jateng; DIY = DIY; ST = Sulteng; SS = Sulsel; SB = Sulbar; B = Bali; NTB = NTB dan M = Marker

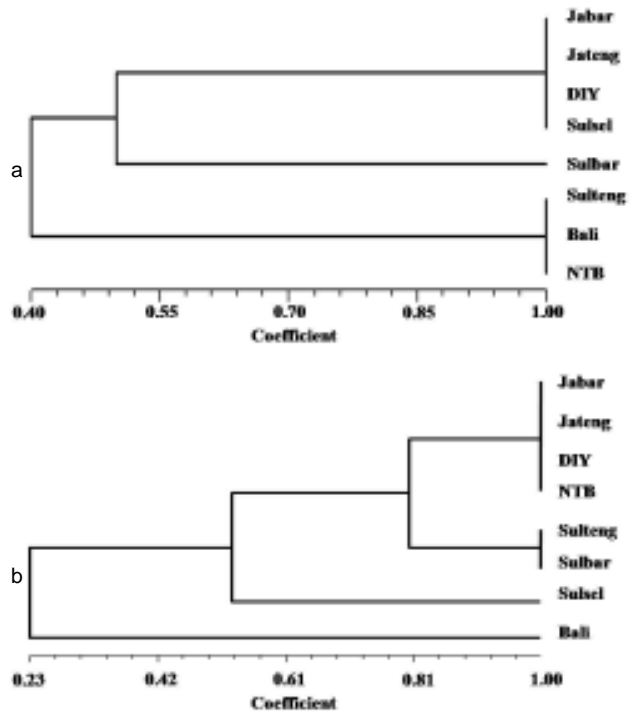
Hasil analisis RFLP dari DNA RTBV menunjukkan bahwa hanya empat isolat yang dapat dipotong oleh enzim *DraI* yaitu isolat dari Sulteng, Sulbar, Bali serta NTB dan masing-masing isolat tersebut terpotong menjadi 2 pita DNA (Gambar 2a). Isolat Sulbar terpotong menjadi 2 pita DNA dengan ukuran sekitar 300 bp dan 100 bp, sedang isolat Sulteng, Bali dan NTB terpotong menjadi 2 pita dengan ukuran sekitar 400 bp dan satu pita sangat pendek sekitar 30 bp yang tidak terlihat pada PAGE. Hasil tersebut berbeda dengan sekuen target amplifikasi pada sekuen RTBV di DDBJ yang dipotong dengan enzim yang sama menjadi dua bagian dengan ukuran masing-masing sekitar 130 bp dan 300 bp.

Analisis RFLP menggunakan enzim *BstYI* terhadap DNA RTSV menghasilkan dua potongan pita DNA pada semua isolat (Gambar 2b). Ukuran dua potongan pita DNA isolat Sulsel dan Bali terlihat berbeda dengan isolat yang lain. Isolat Sulsel terpotong menjadi dua pita DNA berukuran sekitar 700 bp dan 400 bp serta isolat Bali sekitar 750 bp dan 350 bp. Sedangkan isolat yang lain terpotong menjadi dua pita DNA dengan ukuran sekitar 650 bp dan 450 bp. Berdasarkan sekuen target amplifikasi



Gambar 2. Elektroforesis hasil analisis PCR-RFLP beberapa isolat virus tungro pada PAGE: a) DNA RTBV dengan enzim *DraI*; b) DNA RTSV dengan enzim *BstYI*; c) DNA RTSV dengan enzim *HindIII*; JB = Jabar; JT = Jateng; DIY = DIY; ST = Sulteng; SS = Sulsel; SB = Sulbar; B = Bali; NTB = NTB dan M = Marker

pada sekuen RTSV di DDBJ, enzim *BstYI* dapat memotong menjadi dua atau tiga bagian dengan variasi ukuran, bahkan terdapat sekuen dari suatu isolat yang tidak terpotong. Demikian juga dengan hasil analisis RFLP menggunakan enzim *HindIII* yang menunjukkan bahwa terdapat dua isolat yang tidak terpotong yaitu Sulteng dan Sulbar (Gambar 2c). Isolat lainnya terpotong menjadi dua dengan ukuran sekitar 700 bp dan 400 bp kecuali dua potongan pita DNA isolat Bali berukuran sekitar 750 dan 350 bp. Pola potongan pita DNA tersebut sesuai dengan hasil analisis PCR-RFLP terhadap sekuen CP1-CP2 pada beberapa kelompok isolat RTSV dari



Gambar 3. Dendrogram kekerabatan molekuler beberapa isolat virus tungro berdasarkan analisis PCR-RFLP: a) RTBV; b) RTSV; JB = Jabar; JT = Jateng; DIY = DIY; ST = Sulteng; SS = Sulsel; SB = Sulbar; B = Bali dan NTB = NTB

daerah endemis yang berbeda menggunakan kedua enzim yang sama (Azzam *et al.* 2000). Keberadaan potongan pita DNA dengan ukuran yang berbeda antar isolat menunjukkan adanya keragaman baik RTBV maupun RTSV pada tingkat molekuler.

Dendrogram kekerabatan isolat RTBV berdasarkan hasil analisis RFLP menunjukkan bahwa terdapat dua kelompok isolat RTBV sesuai dengan kedekatannya (Gambar 3a). Kelompok pertama terdiri dari isolat Jabar, Jateng, DIY, Sulsel dan Sulbar, sedangkan kelompok kedua meliputi isolat Sulteng, Bali dan NTB. Dendrogram kekerabatan isolat RTSV berdasarkan hasil analisis RFLP menggunakan enzim *BstYI* dan *HindIII* juga menunjukkan adanya dua kelompok isolat RTSV (Gambar 3b). Isolat Bali terpisah dari kelompok yang terdiri dari tujuh isolat yang lain dan ketujuh isolat tersebut terbagi menjadi tiga sub kelompok. Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat pola kekerabatan molekuler yang berbeda antara isolat RTBV dengan RTSV dari masing-masing daerah endemis.

Berdasarkan kelompok isolat pada dendrogram kekerabatan, keragaman molekuler isolat RTBV tidak secara tegas sesuai dengan perbedaan geografi. Terlihat bahwa isolat Sulsel berada di dalam satu kelompok

dengan isolat Jabar, Jateng dan DIY. Demikian juga dengan isolat Sulteng, Bali dan NTB yang tergabung di dalam satu kelompok. Sebaran isolat RTSV di dalam dendrogram kekerabatan menunjukkan adanya kesesuaian antara perbedaan geografi dengan keragaman molekuler secara lebih tegas kecuali isolat NTB. Terlihat bahwa hanya isolat NTB tergabung pada posisi yang sama dengan isolat Jabar, Jateng dan DIY. Berdasarkan kedua dendrogram tersebut, hanya isolat Jabar, Jateng dan DIY yang tergabung dalam satu kerabat pada tingkat molekuler. Hal tersebut mengindikasikan adanya kombinasi antara RTBV dan RTSV di beberapa daerah endemis dengan geografi yang berbeda. RTBV dan RTSV isolat Bali berkerabat jauh dengan isolat yang lain, sedangkan RTBV dan RTSV isolat Jabar berkerabat dekat dengan isolat DIY. RTBV isolat Jabar berkerabat dekat dengan isolat Sulsel, namun isolat RTSV dari keduanya berkerabat agak jauh.

Keragaman Molekuler dan Virulensi Virus Tungro

Dendrogram keragaman molekuler virus tungro berdasarkan analisis PCR-RFLP menunjukkan adanya dua kelompok isolat RTBV dan RTSV. Pola kekerabatan yang terbentuk tidak memperlihatkan adanya hubungan antara keragaman molekuler dengan virulensi masing-masing isolat. Isolat Jateng merupakan isolat paling virulen, namun baik RTBV maupun RTSV isolat Jateng secara konsisten tergabung dalam satu kelompok dengan isolat Jabar dan DIY yang lebih rendah virulensinya. Demikian juga dengan isolat Sulteng dan NTB yang tergabung dalam satu kelompok walaupun virulensi kedua isolat tersebut berbeda.

Pola potongan pita DNA yang terbentuk juga tidak dapat membedakan antara isolat paling virulen dengan isolat yang lebih rendah virulensinya ataupun antara isolat dengan virulensi yang sama. Potongan pita DNA pada isolat Jateng sama dengan isolat Jabar dan DIY

yang berlawanan virulensinya. Isolat DIY dan Sulsel mempunyai virulensi yang sama tetapi terdapat dua pita DNA yang berbeda pada masing-masing isolat (Tabel 3). Hal tersebut menunjukkan bahwa pola potongan pita DNA yang terbentuk tidak berhubungan dengan virulensi masing-masing isolat. Diduga bahwa, virulensi ditentukan oleh adanya interaksi antar ekspresi beberapa gen fungsional dari genom RTBV dan RTSV.

Apabila dilihat hubungan antara kombinasi potongan pita DNA hasil analisis PCR-RFLP dengan enzim *Bst*YI untuk RTSV dan *Dra*I untuk RTBV dengan nilai DI, terlihat bahwa besar nilai DI sama atau lebih dari 7 (Tabel 4). Berdasarkan kombinasi potongan DNA RTBV 430 bp dengan RTSV 650 bp dan 450 bp, terlihat bahwa dua dari lima kasus menunjukkan virulensi tinggi, sedangkan kombinasi lainnya masing-masing satu kasus. Demikian juga kombinasi pasangan pola potongan pita DNA hasil analisis PCR-RFLP dengan enzim *Hind*III untuk RTSV dan *Dra*I untuk RTBV, terlihat bahwa kombinasi potongan DNA RTBV 430 bp dengan RTSV 700 bp dan 400 bp, dua dari lima kasus menunjukkan virulensi tinggi, sedangkan kombinasi lainnya masing-masing satu kasus. Dari kedua kombinasi tersebut mengindikasikan bahwa hubungan antara kombinasi RTSV dan RTBV dengan virulensi virus tungro di beberapa daerah endemis di luar Jawa lebih kompleks dibandingkan dengan Jabar dan Jateng. Jumlah kasus tersebut masih sedikit karena terbatas jumlah lokasi pengambilan sampel, namun terdapat indikasi bahwa kombinasi antara RTSV dan RTBV tertentu dapat memberikan petunjuk adanya variasi virulensi atau tingkat keparahan gejala. Analisis molekuler untuk melihat kombinasi antara RTSV dan RTBV perlu dikembangkan lebih lanjut untuk deteksi dini keparahan gejala tungro yang akan terjadi di suatu daerah endemis. Selain perlu dilakukan karakterisasi molekuler terhadap isolat virus tungro dari daerah endemis yang lain, amplifikasi bagian lain dari genom virus tungro untuk memperoleh informasi keragaman molekuler yang lebih lengkap.

Namun demikian, kesesuaian antara keragaman molekuler dengan virulensi tidak dapat hanya dilihat dari salah satu virus tungro saja, karena keparahan gejala tungro ditentukan oleh infeksi kedua virus tungro. Perubahan sekuen nukleotida pada genom virus dapat menyebabkan perubahan protein yang diekspresi, sehingga berpengaruh terhadap reaksinya terhadap tanaman seperti perubahan patogenisitas dan virulensi (Garcia-Arenal *et al.* 2003). Diduga bahwa virulensi virus tungro melibatkan interaksi sejumlah gen dalam genom virus tungro serta interaksi yang sangat kompleks antara kedua partikel virus tungro. Perbedaan sejumlah asam amino antar isolat perlu dibuktikan apakah terdapat kesesuaian dengan virulensi melalui penelitian lebih lanjut. Perbedaan sejumlah basa nukleotida di sepanjang

Tabel 3. Potongan pita DNA hasil analisis PCR-RFLP dan virulensi virus tungro dari beberapa daerah endemis.

Isolat	RTBV		RTSV		Virulensi
	<i>Dra</i> I (bp)	<i>Bst</i> YI (bp)	<i>Hind</i> III (bp)		DI
Jabar	430	650; 450	700; 400		7,15
Jateng	430	650; 450	700; 400		9,00
DIY	430	650; 450	700; 400		6,35
Sulteng	400; 30	650; 450	1100		7,85
Sulbar	330; 100	650; 450	1100		7,35
Sulsel	430	700; 400	700; 400		6,35
Bali	330; 100	750; 350	750; 350		7,00
NTB	330; 100	650; 450	700; 400		6,85

*Dra*I, *Bst*YI dan *Hind*III = enzim restriksi; DI = indeks penyakit

Tabel 4. Potongan pita DNA hasil analisis PCR-RFLP menggunakan primer *Dral* untuk RTBV dan *BstYI* untuk RTSV dan virulensi virus tungro.

Isolat	Pita DNA polimorfis RTBV (<i>Dral</i>)					Pita DNA polimorfis RTSV(<i>BstYI</i>)						Virulensi	%
	430	400	330	100	30	750	700	650	450	400	350		
Jabar	■						■	■				7,15	40
Jateng	■						■	■				9,00	
Sulteng		■			■		■	■				7,85	20
Sulbar			■	■			■	■				7,35	20
Bali			■	■		■					■	7,00	20

Tabel 5. Potongan pita DNA hasil analisis PCR-RFLP menggunakan primer *Dral* untuk RTBV dan *HindIII* untuk RTSV dan virulensi virus tungro.

Isolat	Pita DNA polimorfis RTBV (<i>Dral</i>)					Pita DNA polimorfis RTSV(<i>BstYI</i>)					Virulensi	%
	430	400	330	100	30	1100	750	700	400	350		
Jabar	■							■	■		7,15	40
Jateng	■							■	■		9,00	
Sulteng		■			■	■					7,85	20
Sulbar			■	■		■					7,35	20
Bali			■	■			■			■	7,00	20

bagian genom lainnya pada masing-masing isolat memungkinkan adanya perbedaan potongan pita DNA yang lebih kompleks. Oleh karena itu, analisis sekuen pada bagian genom yang lain dari setiap isolat diperlukan untuk memperoleh data keragaman molekuler virus tungro yang lebih lengkap.

KESIMPULAN

Virulensi virus tungro dari 8 daerah endemis di Indonesia beragam. Isolat virus tungro Jateng merupakan isolat paling virulen. Tidak semua isolat virus tungro dari daerah endemis di pulau Jawa mempunyai virulensi yang lebih tinggi dibanding isolat dari luar Jawa. Virus tungro dari 8 daerah endemis di Indonesia beragam pada tingkat molekuler. Keragaman dan hubungan kekerabatan molekuler virus tungro tidak sesuai dengan perbedaan geografi daerah endemis dan virulensi. Hubungan antara kombinasi pita DNA RTSV dan RTBV dengan virulensi virus tungro di daerah endemis di luar Jawa lebih kompleks dibandingkan dengan isolat yang berasal dari Jabar dan Jateng. Pola potongan pita DNA

hasil analisis PCR-RFLP dapat digunakan sebagai penanda untuk mendeteksi keragaman virus tungro baik di daerah endemis lain maupun di beberapa daerah dalam satu provinsi atau pulau tertentu untuk mengetahui komposisi populasi virus tungro.

DAFTAR PUSTAKA

- Azzam, O., M.L.M. Yambao, M. Muhsin, K. L. McNally and K. M. L. Umadhay. 2000. Genetic diversity of rice tungro spherical virus in tungro-endemic provinces of the Philippines and Indonesia. *Arch. Virol.* 145: 1183-1197.
- Azzam, O. and T.C.B. Chancellor. 2002. The biology, epidemiology and management of rice tungro disease in Asia. *Plant Disease* 86: 88-100.
- Banerjee, A., S. Roy and J. Tarafdar. 2011. Phylogenetic analysis of Rice tungro bacilliform virus ORFs revealed strong correlation between evolution and geographical distribution. *Virus Genes* 43(3): 398-408.
- Banerjee, A., S. Roy and J. Tarafdar. 2012. The large intergenic region of *Rice tungro bacilliform virus* evolved differentially among geographically distinguished isolates. *Virus Genes*, 44(2): 312-318.

- Cabunagan, R.C., E. Sandig, A. Pamplona and R. Choi. 2003. Use of resistant varieties in the management of rice tungro disease in Iloilo [Philippines]. *J. Trop. Plant Pathol.* 39(1 & 2): 78-79.
- Choi, I.R., P.Q. Cabauatan and R.C. Cabunagan. 2009. Rice Tungro Disease. Rice Fact Sheet, IRRI, Sep. 2009: 1-4.
- Dai, S. and R.N. Beachy. 2009. Genetic engineering of rice to resist rice tungro disease. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 45: 517-524.
- Druka, A. and R. Hull. 2010. Variation of Rice Tungro Viruses: Further Evidence of Two Rice Tungro Bacilliform Virus Strains and Possibly Several Rice Tungro Spherical Virus Variants. *J. Phytopathology* 146(4): 175-178.
- Du, P.V., R.C. Cabunagan and I.R. Choi. 2005. Rice "yellowing syndrome" in Mekong river delta. *Omonrice* 13: 135-138.
- Du, P.V., R.C. Cabunagan, P.Q. Cabauatan, H.S. Choi, I.R. Choi, H.V. Chien and N.H. Huan. 2007. Yellowing syndrome of rice etiology, current status and future challenges. *Omonrice* 15: 94-101.
- Ganesan, U, S.S. Suri, S. Rajasubramaniam, M.V. Rajam and I. Dasgupta. 2009. Transgenic expression of coat protein gene of Rice tungro bacilliform virus in rice reduces the accumulation of viral DNA in inoculated plants. *Virus Genes* 39(1): 113-9.
- García-Arenal, F., A. Fraile and J.M. Malpica. 2003. Variation and evolution of plant virus populations. *Int. Microbiol.* 6: 225-232.
- Joshi, R., V. Kumar and I. Dasgupta. 2003. Detection of molecular variability in rice tungro bacilliform viruses from India using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *J. Virol. Methods* 109: 89-93.
- Khoury, W.E. and K. Makkouk. 2010. Integrated Plant Disease Management in Developing Countries. *J. Plant Pathol.* 92(4): 35-42.
- Kusprayogie, Y., U. Nuzulullia dan D.R. Gabriel. 2011. Prakiraan Serangan OPT Utama Padi pada MT 2011/2012. *Buletin Peramalan OPT, Vol.11/No.2/Edisi XIII /Okt./2011.*
- Mangrauthia, S.K., P. Malathi, S. Agarwal, B. Sailaja, J. Singh, G. Ramkumar, D. Krishnaveni and S.M. Balachandran. 2012a. The molecular diversity and evolution of Rice tungro bacilliform virus from Indian perspective. *Virus Genes* 2012 45(1): 126-138.
- Mangrauthia, S.K., P. Malathi, S. Agarwal, G. Ramkumar, D. Krishnaveni, C.N. Neeraja, M.S. Madhav, D. Ladhakshmi, S.M. Balachandran and B.C. Viraktamath. 2012b. Genetic variation of coat protein gene among the isolates of *Rice tungro spherical virus* from tungro-endemic states of the India. *Virus Genes* 44: 482-487.
- Muralidharan, K., D. Krishnaveni, N.V.L. Rajarajeswari and A.S.R. Prasad. 2003. Tungro epidemics and yield losses in paddy fields in India. *Current Science* 85(8):1143-1147.
- Padmalatha, K. and M.N.V. Prasad. 2006. Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. *African J. Biotechnol.* 5(3): 230-234.
- Praptana, R.H. dan A. Muliadi. 2013. Durabilitas Ketahanan Varietas Padi terhadap Penyakit Tungro. *IPTEK Tanaman Pangan*. 8(1):1-7.
- Purkayastha, A., S. Mathur, V. Verma, S. Sharma and I. Dasgupta. 2010. Virus-induced gene silencing in rice using a vector derived from a DNA virus. *Planta*, Published online: 25 September 2010.
- Savary, S., F. Horgan, L. Willocquet and K.L. Heong. 2012. A review of principles for sustainable pest management in rice. *Crop Protection* 32: 54-63.
- Sharma, S., R. Rabindran, S. Robin and I. Dasgupta. 2011. Analysis of the complete DNA sequence of rice tungro bacilliform virus from southern India indicates it to be a product of recombination. *Arch. Virology*. Published online: 25 August 2011.
- Tangkananond, W., D. Chettanachit and W. Boonnadee. 2005. Isolation and Purification of Rice tungro virus. *Thammasat Int. J. Sc. Tech.* 10(1): 6-18.
- Tyagi, H., S. Rajasubramaniam, M.V. Rajam and I. Dasgupta. 2008. RNA-interference in rice against Rice tungro bacilliform virus results in its decreased accumulation in inoculated rice plants. *Transgenic Res.* 17(5): 897-904.
- Verma, V. and I. Dasgupta. 2007. Sequence analysis of the complete genomes of two Rice tungro spherical virus isolates from India. *Arch. Virol.* 152: 645-648.
- Verma, V., S. Sharma, S.V. Devi, S. Rajasubramaniam and I. Dasgupta. 2012. Delay in virus accumulation and low virus transmission from transgenic rice plants expressing Rice tungro spherical virus RNA. *Virus Genes* 45(2): 350-359.
- Vink, C.J. 2012. A simple PCR-RFLP method to distinguish between species and strains of *Microctonus* parasitoids found in New Zealand. *New Zealand Plant Protect.* 65: 186-191.
- Zhang, H., G. Li, W. Li and F. Song. 2009. Transgenic strategies for improving rice disease resistance. *African J. Biotechnol.* 8(9):1750-1757.