

Ketahanan Akses Jeruk Seedles Terhadap Tiga Strain Virus Tristeza Jeruk (Resistance Seedles Accession to Three Strain of Citrus Tristeza Virus)

Mutia Erti Dwiastuti dan Sri Widyaningsih

Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Jln. Raya Tlekung No. 1, Junrejo, Batu, Jawa Timur, Indonesia 65301

E-mail: mutiaed@gmail.com

Diterima: 17 April 2014; direvisi: 25 Mei 2016; disetujui: 10 September 2016

ABSTRAK. *Citrus tristeza virus* (CTV) merupakan salah satu penyakit yang merugikan secara ekonomi pada jeruk. Penyakit ini telah menyebar merata di pertanaman jeruk seluruh Indonesia. Tiap varietas jeruk mempunyai ketahanan yang berbeda-beda terhadap penyakit ini. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui tingkat ketahanan kandidat jeruk *seedless* hasil mutasi dengan radiasi sinar Gamma terhadap tiga strain penyakit CTV. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Terpadu dan Rumah Kasa Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro) selama 1 tahun. Tahapan yang dilakukan adalah seleksi dan perbanyakan strain CTV, pengujian ketahanan sembilan kandidat mutan dan dua tanaman berasal dari induk, yaitu MT-49, MT-50, MT-52, MT-54, MT-89, MT-92 (mutasi dari tetua K SoE), MT-68 (mutasi dari tetua K Garut), KS 001 (hasil silangan), KS 002 (tetua Tai Ayam), MT P2A6 (mutasi dari tetua pamelon Nambangan1), dan MT P1A4 (mutasi dari tetua Pamelon Nambangan 2). Pengamatan dilakukan terhadap masa inkubasi, intensitas penyakit berdasarkan gejala visual dan uji serologi Elisa. Tingkat ketahanan didasarkan pada gejala visual dan hasil pengujian dengan Elisa. Hasil penelitian menunjukkan gejala *vein clearing*, *vein cupping*, *vein crocking*, dan *stem pitting* ditemukan pada areal pertanaman jeruk. Masa inkubasi CTV pada kandidat mutan dengan inokulasi masing-masing strain bervariasi antara 3–5 minggu. Intensitas penyakit yang timbul akibat inokulasi masing-masing strain bervariasi, demikian juga tingkat ketahanan tanaman. Akses varietas yang resisten terhadap strain CTV parah (*severe strain*) adalah MT P2A6 dan MT P1A4, akses toleran terhadap strain CTV parah adalah MT 49, MT 52, MT 54, MT 68, MT 92, KS 002, dan akses yang peka terhadap strain CTV parah adalah MT 50, MT 89, dan KS 001

Kata kunci: Jeruk; *Seedless*; Strain; Mutan; *Citrus tristeza virus*

ABSTRACT. *Citrus tristeza virus* (CTV) is one of the economically harmful diseases on citrus. The disease has been spread evenly throughout Indonesia citrus crop. Each citrus varieties have different resistance to this disease. The purpose of this study was to determine the candidate's level of resistance mutations result seedless oranges against three strains of CTV disease. Research conducted at Laboratory and Rumah Kasa, Indonesian Citrus and Subtropical Fruit Research (BALITJESTRO), Tlekung, Batu for 1 year. Stages are carried out exploration, collection, and propagation of strains, resistance testing both sembilan candidate's mutation MT-49, MT-50, MT-52, MT-54, MT-89, MT-92 (mutant from K SoE), MT-68 (mutant from K Garut), MT P2A6 (mutant from pamelon Nambangan1), MT P1A4 (mutant from Pamelon Nambangan2) and two types of plant derived from the parent KS 001, KS 002 (elder Tai ayam). Observations made on incubation period, intensity of the disease based on visual symptoms and tested with Elisa. The level of resistance is based on visual symptoms and results of testing with Elisa. The results showed that symptoms of vein clearing, vein cupping, vein crocking, and stem pitting found on citrus planting area. The incubation period of CTV on mutant candidates by inoculation of each strain varied between 3–5 weeks. The intensity of the disease caused by the inoculation of each strain varies, so does the level of plant resistance. Accessions resistant to severe CTV strains (severe strain) is MT MT P2A6 and P1A4, accessions tolerant to severe CTV strains are MT 49, MT 52, MT 54, MT 68, MT 92, 002, and KS-sensitive accession severe CTV strains are MT 50, MT 89, KS 001

Keywords: Citrus; Seedless; Strain; Mutan; *Citrus tristeza virus*

Banjirnya pemasaran jeruk impor di Indonesia, menjadi salah satu indikator bahwa produk jeruk nasional belum mampu bersaing secara global. Secara umum jeruk impor yang laku di pasaran warnanya oranye merata sangat menarik, rasanya manis serta bijinya sedikit. Dalam upaya perbaikan varietas jeruk, preferensi konsumen terhadap kualitas buah jeruk harus dijadikan acuan. Konsumen menginginkan buah jeruk yang warna kulitnya menarik, ukuran seragam, tanpa biji (*seedless*), dan citarasa yang enak. Oleh karena itu idiotipe atau karakter yang ingin dicapai dari kegiatan pemuliaan tanaman jeruk adalah vigoritas tanaman tinggi, *seedless*, warna menarik, dan rasa yang manis (*total soluble seed*) tinggi. Penelitian untuk memperoleh varietas unggul baru jeruk dengan idiotipe tersebut

telah dimulai sejak tahun 2003 di Balitjestro melalui pemuliaan mutasi dan pada tahun 2006 untuk persilangan dan fusi protoplasma. Pemuliaan mutasi fisik jeruk telah dilakukan dengan menggunakan radiasi sinar Gamma 20, 40, dan 60 Gy pada entres yang akan diperbanyak secara vegetatif (Martasari *et al.* 2005). Karakterisasi morfologi, kualitas buah, sitogenetik, dan genetik pada tanaman telah dilakukan pada jeruk keprok dan pamelon hasil mutasi, dan telah diperoleh beberapa kandidat tanaman dengan idiotipe yang diinginkan selama 5 tahun terakhir. Namun, untuk memenuhi persyaratan varietas baru yang bisa diadopsi oleh masyarakat petani, masih dibutuhkan pengamatan terhadap daya hasil, stabilitas karakter, kompatibilitas terhadap beberapa batang bawah, dan ketahanan terhadap hama dan penyakit penting.

Salah satu penyakit penting yang perlu dievaluasi ketahanan terhadap calon varietas unggul baru adalah penyakit *virus tristeza virus* (CTV). Penyakit ini merupakan penyakit penting ke-2 setelah *huanglongbin* (HLB) atau *citrus vein phloem degeneration* (CVPD) yang endemik dan sulit disembuhkan secara kuratif. Gejala di lapang sering ditemukan kompleks bersama dengan HLB sehingga menimbulkan kerusakan lebih parah (Dwiastuti 2011). *Virus tristeza virus* (CTV) merupakan penyakit yang disebabkan oleh *Closterovirus* yang menyerang tanaman jeruk di Indonesia secara endemik (Muharam & Sulyo 1988). Berdasarkan observasi dan referensi yang dikumpulkan, ada tiga strain CTV yang menimbulkan gejala berbeda. (Bar-Joseph *et al.* 1979, Dwiastuti 1989, Dwiastuti 1993, Dwiastuti & Triwiratno 1994a, Dwiastuti & Triwiratno 1994b), yaitu strain lemah menyebabkan nekrosis floem (*floem necrosis*) pada jeruk nipis, jeruk siam, dan jeruk keprok, strain moderat menyebabkan lekuk batang memanjang (*stem pitting*) pada jeruk manis, pamelos, dan strain ganas (*severe strain*) menyebabkan benih menguning (*seedling yellow*) pada jeruk asam dan *grapefruit*. Di Yunani ditemukan strain baru berdasarkan analisis filogenik mengacu pada *virus tristeza seedling yellow* (bio-grup 4) isolat dari Israel (Malandraki *et al.* 2011).

Dari hasil survei yang pernah dilakukan dengan uji *enzyme linked immunosorbent assay* (Elisa), diketahui hampir 88,78% pertanaman jeruk di Indonesia terinfeksi CTV (Roesmiyanto *et al.* 1986). Penyebaran CTV terjadi pada pertanaman jeruk di Jawa, Bali, Riau, Kalimantan Barat, Kalimantan Tengah, dan Kalimantan Selatan. EPPO (2006) menyebutkan bahwa penyebaran CTV terbatas di Indonesia. Penyebaran CTV di dunia sangat global, tercatat pernah menghancurkan pertanaman jeruk di Argentina pada tahun 1930, kemudian menyebar di Brazil pada tahun 1937. Epidemi kemudian terjadi berturut-turut di Ghana pada tahun 1938, California (1939), Florida (1951), Spanyol (1957), Israel (1970), dan Venezuela (1980), dan penyebaran juga telah dilaporkan di sentra pertanaman jeruk yang lain seperti Cyprus (1989), Cuba (1992), Mexico (1995), Republik Dominika (1996), dan Italy (2002) (Bar-Joseph *et al.* 1989, Garnsey *et al.* 2000, Timmer *et al.* 2000, Gottwald *et al.* 2002, Davino *et al.* 2003). Terjadinya serangan CTV dengan strain dan keparahan berbeda dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain penularan oleh aphid, reaktivitas serologi, *double stranded RNA* (dsRNAs), dan pola hibridisasi. Perbedaan strain CTV dapat dibedakan melalui ekspresi karakter biologinya (Zhou *et al.* 2007) untuk mengetahui patogenitasnya pada tanaman indikator berbeda (Garnsey *et al.* 2005)

Deteksi CTV dapat dilakukan dengan cara penyambungan batang bawah dengan entres batang atas jeruk *Mexican Lime* dan beberapa pengujian laboratorium (Roistacher 1991). *Eureka lemon*, *Sour orange*, dan *grapefruit* umum digunakan untuk indeksing strain *seedling yellows*, Elisa dan *strip test* digunakan untuk pengujian laboratorium (Su 2008), selain DTBIA (*direct tissue blot immunoassay*) yang sukses menggantikan Elisa untuk monitoring penyakit CTV secara massal menggunakan berbagai macam jaringan tanaman (Cambra *et al.* 2000, Djelouah *et al.* 2002).

Tujuan penelitian ini ialah mengetahui ketahanan aksesori mutan jeruk *seedless* terhadap tiga strain CTV yang berbeda. Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini adalah ketahanan kandidat mutan dari tanaman jeruk *seedless* terhadap cCTV rendah sampai sedang (toleran)

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret-Desember 2010 di Laboratorium Terpadu dan Rumah Kasa Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro), Batu, Jawa Timur. Alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu Elisa reader, autoclave, plate Elisa, mikropipet, mortal, microtube dan lain-lain. Bahan yang digunakan meliputi kit Elisa CTV (Agdia), batang bawah *Japansche Citroen* (JC), tanaman jeruk indikator *Mexican lime*, dan mata tempel sebelas aksesori tanaman jeruk hasil mutasi fisik dengan sinar gamma : MT-49, MT-50, MT-52, MT-54, MT-89, MT-92 (mutasi dari tetua Keprok SoE), MT-68 (mutasi dari tetua Keprok Garut), KS 001 (hasil silangan), KS 002 (tetua keprok Tai Ayam), MT P2A6 (mutasi dari tetua pamelos Nambangan 1), dan MT P1A4 (mutasi dari tetua pamelos Nambangan 2).

Seleksi Sumber Inokulum Strain CTV

Tiga jenis strain CTV, yaitu ringan (*mild*), sedang (*moderate*), dan parah (*severe*) diseleksi dari sentra jeruk nipis di Banyuwangi, Tulungagung, dan Blitar. Seleksi sampel ranting dilakukan dengan cara memilih tanaman jeruk di lapang berdasarkan kriteria gejala visual dan hasil uji serologi ELISA. Kriteria strain *mild* (ringan) berdasarkan asal dari sumber tanaman tidak bergejala atau *vein clearing* ringan serta menunjukkan hasil ELISA ($\geq 2 \times$ kontrol negatif = NC, < dari kontrol positif = PC), kriteria *moderate* (sedang) berasal dari tanaman bergejala *vein cupping*, *vein clearing*, *stem pitting*, dan nilai absorbansi uji Elisa (\geq PC), *severe* (parah), gejala *stem pitting*, *vein*

crocking, *seedling yellow*, kerdil, dan nilai absorbansi hasil uji Elisa tinggi ($\geq 2x$ PC). Sampel yang sudah dianalisis Elisa, diinokulasikan pada tanaman jeruk nipis (*Mexican lime*) dengan batang bawah *Japansche Citroen*. Inokulasi strain CTV dengan cara penempelan kulit tanpa mata, tiap tanaman jeruk nipis diinokulasi dengan cara menggunakan tiga kulit sesuai dengan strain perlakuan. Pemeliharaan tanaman dilakukan dengan optimal seperti pemeliharaan benih jeruk bebas penyakit yang direkomendasikan (Hardiyanto *et al.* 2010).

Uji Ketahanan Akses Jeruk *Seedless* Terhadap Tiga Strain CTV

Mata tempel dari masing-masing tanaman akses diperbanyak pada batang bawah JC. Masing-masing akses diperbanyak tiga ulangan, dengan masing-masing ulangan empat unit. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak kelompok, yaitu kombinasi 11 akses jeruk (kandidat mutan hasil radiasi dengan sinar gamma: MT-49, MT-50, MT-52, MT-54, MT-68, MT-89, MT-92, induk *seedles* baru: KS-001, KS-002, dan kandidat mutan hasil radiasi dengan sinar gamma: MT P2A6, MT P1A4), dan strain CTV (ringan, sedang, ganas hasil seleksi tahap A) dan kontrol tanpa inokulasi CTV. Tiap tanaman batang bawah *Japansche citroen* (JC) ditempel dengan satu mata tempel akses, kemudian bagian batang bawah diinokulasi dengan tiga kulit *Mexican lime* sebagai sumber strain CTV. Pengamatan dilakukan terhadap masa inkubasi, intensitas penyakit, dan uji Elisa serta penghitungan ketahanan tanaman. Masa inkubasi dilakukan dengan mengamati periode mulai tanaman diinokulasi sampai munculnya gejala yang diamati mulai 2 minggu (saat mulai tumbuh daun baru). Intensitas penyakit diamati berdasarkan gejala visual dengan interval pengamatan tiap 2 minggu mulai gejala muncul sampai 3,5 bulan setelah inokulasi. Intensitas penyakit CTV dihitung dengan rumus:

$$\frac{\sum(n \times v)}{N \times z} \times 100\%$$

- P = Intensitas penyakit (%)
n = Jumlah tanaman yang memiliki kriteria gejala sama
v = Kriteria gejala
z = Nilai kriteria gejala tertinggi
N = Jumlah tanaman yang diamati

Dengan kriteria gejala /skor berdasarkan (Garnsey *et al.* 2005 & Corazza *et al.* 2006) yang dimodifikasi sebagai berikut:

- 0 = Tidak ada gejala
1 = Gejala ringan 10–25% daun bergejala *vein clearing*
2 = Gejala *vein clearing* parah ($\geq 25\%$)
3 = Gejala *vein cupping*
4 = Gejala *stem pitting*
5 = Kombinasi gejala pada skor 1, 2, 3, dan 4

Uji ELISA dengan prinsip uji serologi menggunakan antibodi CTV, dilakukan untuk memastikan ada tidaknya CTV dalam jaringan tanaman yang diuji, dan dilakukan 3 bulan setelah perlakuan (inokulasi penempelan). Jumlah sampel daun yang diuji sebanyak 3–5 helai daun dari tiap tanaman perlakuan. Protokol uji Elisa yang digunakan menurut metode Clark & Adams (1977) dan Bar-Joseph *et al.* (1979) yang dimodifikasi. Seratus μ l ekstrak tanaman yang diuji (0,3 g tulang daun yang telah dihaluskan dengan mortar ditambah 3 ml buffer ekstrak) dimasukkan ke lubang Elisa *plate* yang telah dilapisi dengan 100 μ l larutan coating antibodi CTV (Agdia CAB 78900). Setelah diinkubasi semalam pada suhu 4°C, dibilas dengan 1X PBST sebanyak 3 x, kemudian dimasukkan 100 μ l larutan enzim konjugat *alkaline phosphate conjugate* (Agdia CEA 78900) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam. Setelah pembilasan dengan 1X PBST empat kali dilakukan, kemudian ditambahkan 100 μ l larutan PNP 1 mg/ml (Agdia ACC00404) dalam setiap lubang *plate*. Pembacaan hasil Elisa secara kuantitatif (kolorimetri) dengan pengukuran nilai absorbansi menggunakan Elisa reader pada filter 405 nm. Penentuan kriteria ketahanan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Penentuan kriteria ketahanan (*Criteria for CTV resistance*)

| Kriteria ketahanan (<i>Resistant criteria</i>) | Gejala visual (<i>Visual symptom</i>) | Hasil uji Elisa (<i>Result of Elisa test</i>) |
|--|---|--|
| Tahan (<i>Resistant</i>) | Tidak bergejala atau <i>vein clearing</i> ringan | <ul style="list-style-type: none"> • ≤ 2 x kontrol negatif = NC • < dari kontrol positif = PC |
| Toleran (<i>Tolerant</i>) | Bergejala <i>vein clearing</i> sedang, <i>vein cupping</i> | <ul style="list-style-type: none"> • = PC |
| Peka (<i>Susceptible</i>) | Gejala <i>stem pitting</i> , <i>vein crocking</i> , <i>seedling yellow</i> , kerdil | <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 2 PC |

Data yang terkumpul dianalisis dengan analisis varian dan diuji lanjut dengan uji DMRT 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi Sumber Inokulum Strain CTV

Berdasarkan hasil seleksi sumber inokulum yang dikumpulkan dari berbagai lokasi, ditemukan variasi gejala *vein clearing*, *vein crocking*, *vein cupping*, dan *stem pitting* pada ranting (Gambar 1). Fenomena gejala tersebut menguatkan dugaan bahwa CTV yang ada di Indonesia ada beberapa strain dan menimbulkan ekspresi gejala yang berbeda. Menurut (Moreno *et al.* 2008) perbedaan gejala CTV bergantung pada strain virus, varietas jeruk, dan kombinasi batang atas dan batang bawah. Kerusakan anatomi, fisiologis, dan biokimia, akibat infeksi CTV yang berkembang di floem jaringan tanaman jeruk, menyebabkan munculnya gejala *vein clearing*, *vein cupping*, *stem pitting*, dan *vein crocking* (gambar 1a, b, c, dan d) yang intensitasnya bervariasi tergantung dari virulensi strain dan titer virus (Bekolo *et al.* 2007).

Hasil eksplorasi strain CTV dari tiga daerah ditampilkan pada Tabel 2. Dari 53 isolat yang dikoleksi dari 10 desa dan lima kecamatan pada tiga kabupaten, ditemukan dikarakterisasi berdasarkan gejala di lapang dan hasil uji Elisa, diperoleh tiga macam kriteria strain, mulai ringan sampai parah. Gejala yang terbanyak ditemukan adalah *vein clearing* (23 isolat) dan gejala *stem pitting* hanya ditemukan di dua lokasi. Isolat-

isolat CTV yang dikoleksi, diperbanyak pada jeruk nipis (*Mexican lime*), tanaman indikator terbaik untuk mengetahui virulensi strain CTV pada daerah endemik penyakit CTV secara alami (Bekolo *et al.* 2007) atau bisa juga menggunakan jeruk lemon Lisbon sebagai pembeda antarstrain dengan melakukan pengamatan diameter batang pada sambungan batang atas dan batang bawah. Strain yang dipilih untuk pengujian seleksi adalah CTV-44 untuk strain lemah dengan gejala *vein clearing*, CTV-35 untuk strain sedang dengan gejala *vein crocking*, dan strain ganas yaitu CTV-24 (bergejala *stem pitting* pada ranting) dan CTV-28 (bergejala *vein cupping* ringan, *vein crocking*, dan *stem pitting* ringan).

Uji Ketahanan Aksesori Jeruk *Seedless* Terhadap Tiga Strain CTV

Hasil pengamatan terhadap masa inkubasi menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan nyata antar perlakuan aksesori *seedless* dan strain CTV. Penularan CTV pada aksesori kandidat mutan *seedless* bervariasi antara 2 sampai 5 minggu (Tabel 3). Strain lemah 4,82 minggu, strain sedang 4,45 minggu, dan strain ganas 4 minggu. Semakin parah strain yang diinokulasikan, masa inkubasi pada tanaman jeruk cenderung semakin pendek.

Rerata gejala visual yang tampak dari perlakuan yang diuji, tidak terlalu tinggi. Pada perlakuan inokulasi dengan strain lemah CTV34 yang diamati pada minggu ke-4 sampai ke-14 menunjukkan rerata intensitas penyakit kecil, yaitu antara 0-3,34%. Aksesori MT-52, MT-89, dan MT-P2A6, tidak terinfeksi



Gambar 1. Variasi gejala serangan CTV yang ditemukan di lapangan (*Incidence symptoms of CTV are found in field*), (a) *vein clearing*, (b) *vein crocking*, (c) *vein cupping*, dan (d) *stem pitting*)

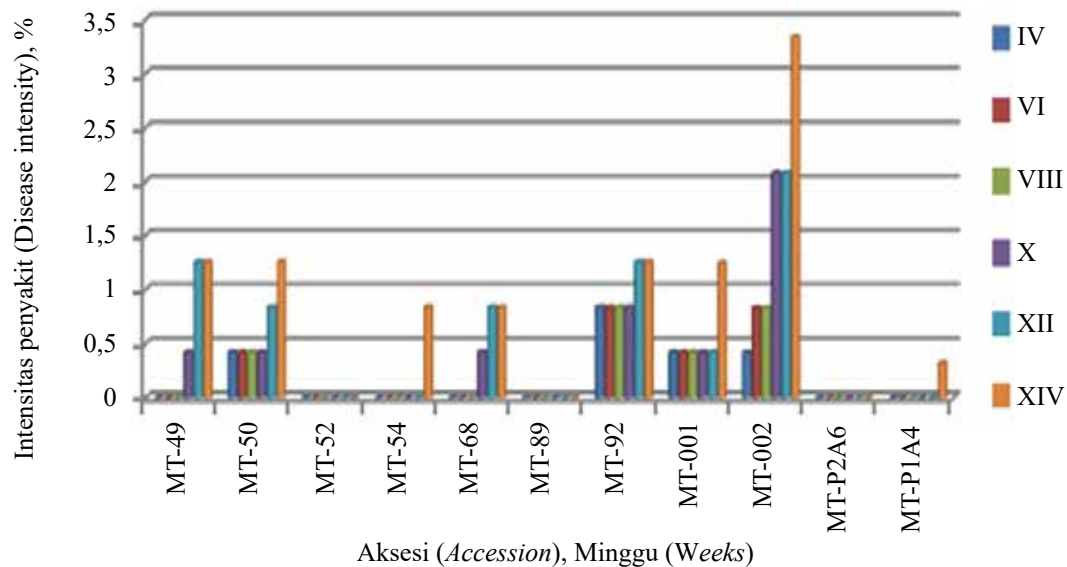
Tabel 2. Hasil eksplorasi strain CTV dari tiga daerah pertanaman jeruk (Banyuwangi, Tulungagung dan Blitar) serta katagori strain berdasarkan gejala visual [Exploration results of CTV strain on three citrus garden (Banyuwangi, Tulungagung, and Blitar) and strains categories based on visual symptoms]

| Kode isolat | Asal sampel (Desa/Kecamatan) (Origin) (Isolat cabai) | | Gejala (Symptom) | Nilai Absorbansi Elisa | Katagori (Category) |
|------------------------------|---|------------------|---|---------------------------|------------------------|
| Kabupaten Banyuwangi | | | | | |
| | Desa | Kecamatan | | | |
| 1 | Tegalrejo | Purwoharjo | <i>Vein clearing</i> ringan | 0.153 | Ringan |
| 2 | Tegalrejo | Purwoharjo | <i>Vein clearing</i> ringan | 0.005 | Tidak terinfeksi |
| 3 | Tegalrejo | Purwoharjo | <i>V.cupping, V.crooking</i> | 0.009 | Tidak terinfeksi |
| 4 | Tegalrejo | Purwoharjo | <i>V.clearing</i> | 0.135 | Ringan |
| 5 | Tegalrejo | Purwoharjo | <i>V.crooking</i> | 0.152 | Ringan |
| 6 | Tegalrejo | Purwoharjo | <i>Yellowing</i> | 0.003 | Tidak terinfeksi |
| 7 | Bulurejo | Purwoharjo | <i>V.cupping</i> ringan, <i>V.clearing</i> | 0.152 | Ringan |
| 8 | Sidorejo | Purwoharjo | <i>V.crooking, V.cupping</i> ringan | 0.150 | Ringan |
| 9 | Sidorejo | Purwoharjo | <i>V.cupping</i> ringan | 0.022 | Tidak terinfeksi |
| 10 | Kalipait | Tegaldlimo | <i>V. crooking, V.clearing</i> ringan | 0.149 | Ringan |
| 11 | Kalipait | Tegaldlimo | <i>V.cupping</i> ringan | 0.148 | Ringan |
| 12 | Kalipait | Tegaldlimo | <i>V.cupping</i> ringan | 0.146 | Ringan |
| 13 | Kalipait | Tegaldlimo | <i>Vein clearing</i> ringan | 0.152 | Ringan |
| 14 | Kalipait | Tegaldlimo | <i>V.crooking</i> ringan | 0.153 | Ringan |
| 15 | Sumberasih | Purwoharjo | Daun menguning | 0.147 | Ringan |
| 16 | Sumberasih | Purwoharjo | Sebagian daun tanaman hijau dan kuning | 0.154 | Ringan |
| 17 | Sumberasih | Purwoharjo | Tanaman kerdil | 0.163 | Ringan |
| 18 | Sumberasih | Purwoharjo | <i>Croking</i> | 0.161 | Ringan |
| | | | | NC | 0,045 |
| | | | | PC | 0,172 |
| Kabupaten Tulungagung | | | | | |
| 19 | Pulosari | Ngunut | <i>V.clearing</i> | 0.226 | Parah |
| 20 | Pulosari | Ngunut | <i>V.clearing</i> | 0.037 | Tidak terinfeksi |
| 21 | Kromasan | Ngunut | <i>V.cupping, V.clearing</i> | 0.246 | Parah |
| 22 | Kromasan | Ngunut | <i>V.crooking</i> | 0.226 | Parah |
| 23 | Kromasan | Ngunut | <i>V.cupping, V.crooking</i> | 0.148 | Sedang |
| 24 | Kromasan | Ngunut | <i>Stem pitting</i> ranting | 0.251 | Parah |
| 25 | Kromasan | Ngunut | <i>V. cupping</i> ringan, <i>V. clearing</i> | 0.227 | Parah |
| 26 | Kromasan | Ngunut | <i>V.clearing</i> | 0.117 | Sedang |
| 27 | Pulosari | Ngunut | <i>V.crooking</i> | 0.042 | Tidak terinfeksi |
| 28 | Pulosari | Ngunut | <i>V.cupping</i> ringan, <i>V. crooking, stem pitting</i> ringan | 0.224 | Parah |
| 29 | Pulosari | Ngunut | <i>V.clearing</i> | 0.242 | Parah |
| 30 | Pulosari | Ngunut | <i>V.cupping</i> ringan | 0.237 | Parah |
| 31 | Pelem | Campur darat | Kekurangan Mg | 0.221 | Parah |
| | | | | NC | 0,056 |
| | | | | PC | 0,106 |
| Kabupaten Blitar | | | | | |
| 32 | Selopuro | Selopuro | <i>V.crooking</i> | 0.051 | Tidak terinfeksi |
| 33 | Selopuro | Selopuro | <i>V.clearing</i> | 0.216 | Parah |
| 34 | Selopuro | Selopuro | <i>V.clearing</i> | 0.065 | Ringan |
| 35 | Selopuro | Selopuro | <i>V.crooking</i> | 0.179 | Sedang |
| 36 | Selopuro | Selopuro | <i>V.crooking</i> | 0.146 | Sedang |
| 37 | Selopuro | Selopuro | <i>V.clearing</i> | 0.261 | Parah |
| 38 | Selopuro | Selopuro | <i>V.clearing</i> | 0.248 | Parah |
| 39 | Selopuro | Selopuro | <i>V.clearing</i> | 0.245 | Parah |
| 40 | Selopuro | Selopuro | <i>V.crooking</i> | 0.188 | Sedang |
| 41 | Selopuro | Selopuro | <i>V.clearing</i> | 0.160 | Sedang |
| 42 | Selopuro | Selopuro | <i>V.clearing</i> | 0.147 | Sedang |
| 43 | Selopuro | Selopuro | <i>V.cupping, V.clearing</i> | 0.123 | Sedang |
| 44 | Selopuro | Selopuro | <i>V.clearing</i> | 0.025 | Tidak terinfeksi |
| 45 | Selopuro | Selopuro | <i>V.clearing</i> | 0.255 | Parah |
| 46 | Selopuro | Selopuro | <i>V.crooking</i> | 0.253 | Parah |
| 47 | Selopuro | Selopuro | <i>V.cupping, blotching</i> | 0.247 | Parah |
| 48 | Selopuro | Selopuro | <i>V.clearing</i> | 0.230 | Parah |
| 49 | Selopuro | Selopuro | <i>V.cupping, V.clearing</i> | 0.218 | Parah |
| 50 | Selopuro | Selopuro | <i>V.clearing, V.crooking, V.cupping</i> | 0.160 | Parah |
| 51 | Selopuro | Selopuro | <i>V.crooking</i> | 0.225 | Parah |
| 52 | Selopuro | Selopuro | Daun menguning | 0.160 | Sedang |
| 53 | Selopuro | Selopuro | Sebagian daun tanaman hijau dan kuning | 0.178 | Sedang |

Tabel 3. Masa inkubasi penyakit CTV pada aksesi kandidat *seedless* yang diinokulasi dengan tiga strain CTV (*CTV disease incubation periods of inoculated seedless candidate accession with three strain of CTV*)

| No. | Kode aksesi jeruk <i>seedless</i> (Code of <i>seedless citrus candidate</i>) | Masa inkubasi (<i>Period of incubation</i>), Minggu (<i>Weeks</i>) | | |
|------------|---|--|---|--|
| | | Strain lemah CTV 34 (<i>Mild strain CTV34</i>) | Strain sedang CTV 35 (<i>Moderate strain CTV35</i>) | Strain ganas CTV 24 (<i>Severe strain CTV24</i>) |
| 1. | MT-49 | 5 b* | 3 ab | 5 b * |
| 2. | MT-50 | 5 b | 3 ab | 3 ab |
| 3. | MT-52 | 0 a | 0 a | 0 a |
| 4. | MT-54 | 5 b | 5 b | 2 a |
| 5. | MT-68 | 5 b | 5 b | 5 b |
| 6. | MT-89 | 0 a | 5 b | 2 a |
| 7. | MT-92 | 5 b | 5 b | 2 a |
| 8. | KS 001 | 3 ab | 5 b | 5 b |
| 9. | KS 002 | 5 b | 3 ab | 5 b |
| 10. | MT P2A6 | 0 a | 0 a | 0 a |
| 11. | MT P1A4 | 5 b | 0 a | 0 a |
| KK (CI), % | | 4,7 | 4,36 | 2,97 |

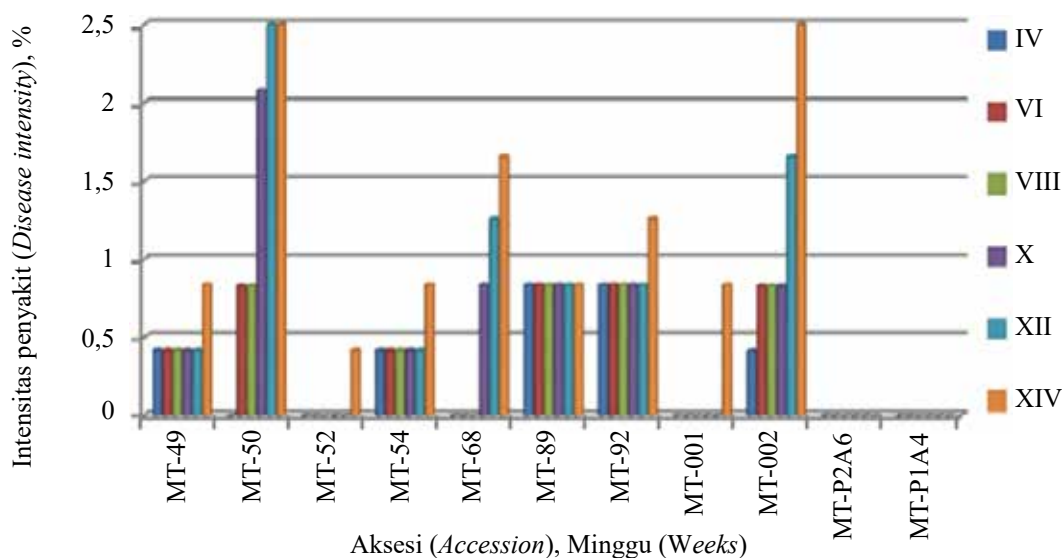
- *Bilangan yang didampingi huruf pada kolom yang sama, tidak berbeda nyata pada uji Duncan 5% (*Mean follows by the same letters on the same columns is not significantly according Duncan test 5%.*)
- kode aksesi MT-49, MT-50, MT-52, MT-54, MT-89, MT-92 merupakan hasil mutasi dengan perlakuan radiasi sinar gamma dari tetua K SoE), MT-68 merupakan hasil mutasi dengan perlakuan sinar gamma dari tetua K Garut), kode aksesi KS 001 (hasil silangan hibridisasi keprok x siam), KS 002 merupakan tetua Tai Ayam, induk *seedles* baru, kode aksesi MT P2A6 merupakan hasil mutasi dengan perlakuan sinar gamma dari tetua Pamelo Nambangan1), MT P1A4 merupakan hasil mutasi dengan perlakuan sinar gamma dari tetua pamelo Nambangan 2



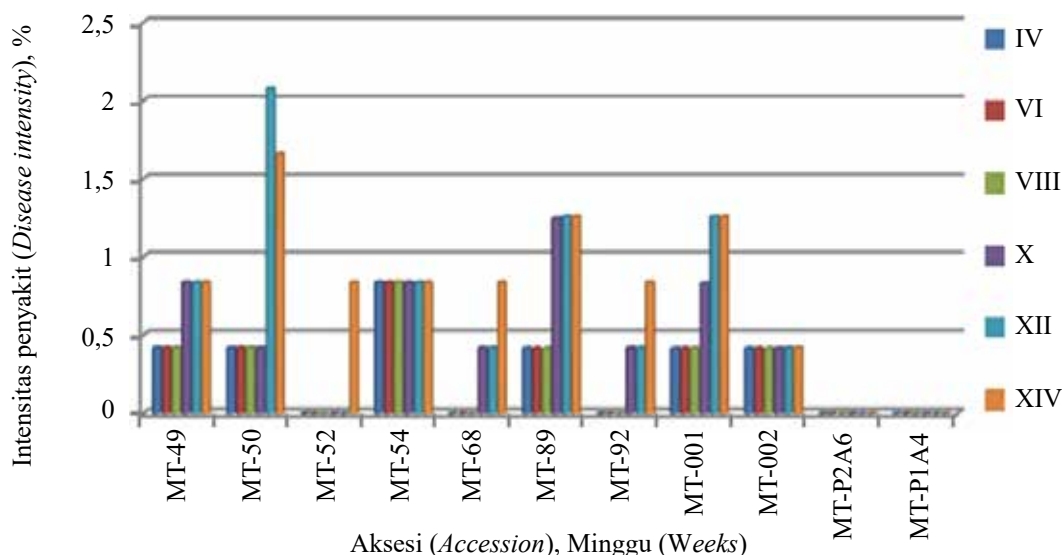
Gambar 2. Intensitas penyakit CTV pada 11 aksesi yang diinokulasi strain lemah pada pengamatan minggu ke-4 sampai minggu ke-14 setelah inokulasi (*Disease intensity on inoculated accession with mild strains of CTV, four weeks until 14 weeks after inoculation*)

sampai minggu ke-14 setelah inokulasi (Gambar 2). Intensitas penyakit tertinggi pada KS-002 (3,34%). KS 002 merupakan jenis jeruk varietas Tai Ayam yang bukan merupakan hasil mutasi dan telah lama ditanam di lapangan sehingga kemungkinan sudah terserang penyakit CTV. Laporan Ayazpour *et al.* (2011) di Malaysia, menyebutkan bahwa jeruk nipis

sangat sensitif terhadap hampir semua strain yang ada di sana, *grapefruit* dan jeruk manis hanya peka pada strain ganas saja dan ketahanan umum terjadi pada jeruk *Trifoliata*, dan pada beberapa strain terhadap jeruk pamelo dan kumquat. Gejala pada KS002 paling tinggi dan berbeda nyata dengan perlakuan lain pada minggu ke-14.



Gambar 3. Intensitas penyakit CTV pada 11 aksesori yang diinokulasi strain sedang (*moderate*) pada pengamatan minggu ke-4 sampai minggu ke-14 setelah inokulasi. (*Disease intensity on inoculated accession with moderate strains of CTV, four weeks until 14 weeks after inoculation*)



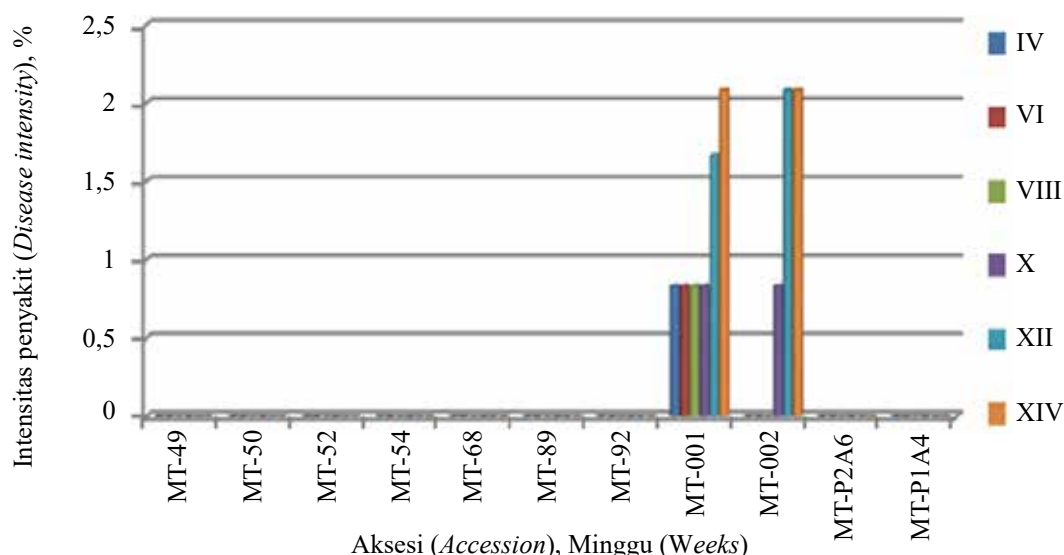
Gambar 4. Intensitas penyakit CTV pada 11 aksesori yang diinokulasi strain ganas (*severe*) pada pengamatan minggu ke-4 sampai minggu ke-14 setelah inokulasi (*Disease intensity on inoculated accession with severe strains of CTV, four weeks until 14 weeks after inoculation*)

Inokulasi dengan strain sedang CTV35 menunjukkan bahwa aksesori MT-50 dan KS-002 (2,5%) paling tinggi gejala visual yang timbul dibanding perlakuan lain, sedang aksesori MT-P2A6 dan MT-P1A4 paling rendah (Gambar 3). Inokulasi dengan CTV strain sedang ini menunjukkan intensitas penyakit yang lebih bervariasi pada semua aksesori.

Inokulasi dengan strain ganas CTV menunjukkan aksesori MT-P2A6 dan MT-P1A4 juga tidak bergejala sama sekali (Gambar 4). Aksesori tersebut merupakan hasil mutasi jeruk pamelon Nambangan. Di lapangan jenis jeruk pamelon biasanya tidak bermasalah dengan CTV atau termasuk tahan. Hasil penelitian

ini menunjukkan hasil yang seiring dengan kondisi rerata di lapangan. Inokulasi aksesori hasil mutasi pamelon Nambangan dengan CTV strain ringan, sedang, dan parah tidak bergejala sama sekali, kecuali yang diinokulasi dengan strain ringan pada MT-P1A4 menunjukkan gejala CTV dengan intensitas penyakit 0,32% pada minggu ke-14 setelah inokulasi (penempelan) sehingga aksesori hasil mutasi pamelon ini diduga mempunyai ketahanan terhadap penyakit CTV, sama dengan laporan Ayazpour *et al.* (2011) di Malaysia.

Menurut hasil penelitian Taufik *et al.* (2000) bahwa inokulasi CTV melalui kutu daun (*aphid*)



Gambar 5. Intensitas penyakit CTV pada 11 aksesori tanpa inokulasi strain CTV (kontrol) pada pengamatan minggu ke-4 sampai minggu ke-14 setelah inokulasi (*Disease intensity on non inoculated accession, four weeks until 14 weeks after inoculation*)

Tabel 4. Hasil pengujian Elisa pada 11 aksesori yang diinokulasi tiga strain *Citrus tristeza virus* (CTV disease intensity based on result of Elisa test on 11 accession was inoculated with three strain of *Citrus tristeza virus*)

| No. | Kode aksesori (Accession code) | Persentase tanaman positif terinfeksi CTV berdasarkan uji Elisa (Percentage of plants infected with CTV positive by Elisa test) % | | | |
|-----|--------------------------------|---|---------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| | | Strain ganas (Severe strain) | Strain sedang (Moderate strain) | Strain ringan (Mild strain) | Kontrol (Control) |
| 1. | MT-49 | 66,7 | 33,3 | 0,0 | 0,0 |
| 2. | MT-50 | 33,3 | 33,3 | 0,0 | 0,0 |
| 3. | MT-52 | 66,7 | 0,0 | 33,3 | 0,0 |
| 4. | MT-54 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 5. | MT-68 | 0,0 | 33,3 | 0,0 | 0,0 |
| 6. | MT-89 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 7. | MT-92 | 33,3 | 0,0 | 33,3 | 0,0 |
| 8. | KS-001 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 0,0 |
| 9. | KS-002 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 0,0 |
| 10. | MT-P2A6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 11. | MT-P1A4 | 0,0 | 33,3 | 0,0 | 0,0 |

kode aksesori MT-49, MT-50, MT-52, MT-54, MT-89, MT-92 merupakan hasil mutasi dengan perlakuan radiasi sinar gamma dari tetua K SoE), MT-68 merupakan hasil mutasi dengan perlakuan sinar gamma dari tetua K Garut), kode aksesori KS 001(hasil silangan hibridisasi Keprok x siam), KS 002 merupakan tetua Tai Ayam, induk *seedles* baru, kode aksesori MT P2A6 merupakan hasil mutasi dengan perlakuan sinar gamma dari tetua pamelon Nambangan1), MT P1A4 merupakan hasil mutasi dengan perlakuan sinar gamma dari tetua pamelon Nambangan 2.

pada jenis pamelon Nambangan juga menunjukkan tidak terinfeksi CTV dan tidak mengalami hambatan pertumbuhan tanaman, hal ini diduga karena kutu daun tidak mampu menularkan CTV ke dalam sel tanaman inang dan tanaman memiliki mekanisme nonpreferensi atau antixenosis terhadap serangga. Di Florida, jenis pamelon menunjukkan ketahanan yang selektif dan spesifik terhadap beberapa isolat CTV penyebab *stem*

pitting parah, tetapi mempunyai kerentanan yang tinggi terhadap isolat yang lain (Chung & Brlansky 2009).

Pada perlakuan kontrol tanpa inokulasi (kontrol) menunjukkan bahwa semua aksesori yang diuji tidak menunjukkan gejala sampai minggu ke 14, kecuali pada aksesori KS 001 dan KS 002 (Gambar 5). Aksesori KS 001 sudah bergejala sejak minggu ke-4 dan KS 002 mulai menunjukkan kontaminasi CTV pada minggu ke-10.

Tabel 5. Ketahanan kandidat *seedless* yang diinokulasi dengan tiga strain *Citrus tristeza virus* (*Resistance of inoculated seedless candidate with three strains Citrus tristeza virus*)

| Kriteria ketahanan (<i>Resistance criteria</i>) | Strain CTV (<i>CTV strains</i>) | | |
|--|--|---------------------------------------|--|
| | Ringan (<i>Mild</i>) | Sedang (<i>Moderate</i>) | Ganas (<i>Severe</i>) |
| Tahan (<i>Resistant</i>) | MT 52, MT 89, MT P2A6 | MT P2A6 MT P1A4 | MT P2A6 MT P1A4 |
| Toleran (<i>Tolerant</i>) | MT 54, MT 68, MT P1A4 | MT 49, MT 52, MT 54, MT 89, KS 001 | MT 49, MT 52, MT 54, MT 68, MT 92, KS 002 |
| Peka (<i>Susceptible</i>) | MT 49, MT 50, MT 92, KS 001, KS 002 | MT 50, MT 68, MT 92, KS 002 | MT 50, MT 89, KS 001 |

kode akses MT-49, MT-50, MT-52, MT-54, MT-89, MT-92 merupakan hasil mutasi dengan perlakuan radiasi sinar Gamma dari tetua K SoE), MT-68 merupakan hasil mutasi dengan perlakuan sinar Gamma dari tetua K Garut), kode akses KS 001(hasil silangan hibridisasi Kepron x siam), KS 002 merupakan tetua Tai Ayam, induk *seedless* baru, kode akses MT P2A6 merupakan hasil mutasi dengan perlakuan sinar Gamma dari tetua pamelon Nambangan1), MT P1A4 merupakan hasil mutasi dengan perlakuan sinar Gamma dari tetua pamelon Nambangan 2

Hasil ini diperkuat dengan hasil pengujian dengan teknik Elisa disajikan pada Tabel 4. Pada akses KS 001 dan KS 002, dengan diinokulasi strain CTV ringan, sedang, dan parah maupun tidak diinokulasi menunjukkan positif CTV berdasarkan pengujian Elisa. Akses KS 001 dan KS 002 merupakan tanaman koleksi hasil persilangan, dan tetua baru *seedless*, yang diduga akses ini sudah positif CTV. Inokulasi CTV strain ganas menyebabkan 36,36% tanaman terdeteksi positif CTV. Inokulasi CTV strain sedang mengakibatkan 30,30% tanaman terdeteksi CTV, sedangkan inokulasi dengan strain lemah 24,24 % tanaman terinfeksi CTV. Menurut penelitian Liu *et al.* (2012) perubahan transkripsional tiga gen yang dipelajari pada tanaman yang diinokulasi CTV menunjukkan lebih terimbas jika diinokulasi dengan strain ganas CTV-N21 dibandingkan dengan strain ringan CTV-N4. Pada akses MT-49, MT-50, MT-52, MT-54, MT-89, MT-92 (mutasi dari tetua K SoE), MT-68 (mutasi dari tetua K Garut), KS 001(hasil silangan), KS 002 (tetua Tai ayam), MT P2A6 (mutasi dari tetua pamelon Nambangan1), MT P1A4 (mutasi dari tetua pamelon Nambangan 2). Sama dengan hasil penelitian Corazza *et al.* (2006) yang menyatakan bahwa akses plasma nutfah jeruk *grapefruit* (persilangan pamelon dan manis) menunjukkan karakter gejala ringan dan sedang sebagai indikator toleran.

Berdasarkan gejala visual dan hasil uji Elisa pada Tabel 3 dan 4, diperoleh pengelompokan ketahanan pada akses jeruk *seedless* terhadap CTV strain ringan (*mild strain*) sebagai berikut: MT 52, MT 89, MT P2A6 termasuk kriteria tahan, MT 52, MT 89, MT P2A6 termasuk kriteria toleran, MT 49, MT 50, MT 92, KS 001, KS 002 termasuk kriteria peka. Pengelompokan ketahanan terhadap CTV strain sedang (*moderate strain*) adalah : MT P2A6, MT P1A4 termasuk kriteria peka; MT 49, MT 52, MT 54, MT 89, KS 001 termasuk toleran dan

MT 50, MT 68, MT 92, KS 002 termasuk kriteria peka terhadap strain moderat CTV. Berikutnya pengelompokan ketahanan terhadap strain ganas CTV (*severe strain*) adalah sebagai berikut : MT P2A6, MT P1A4 tahan, MT 49, MT 52, MT 54, MT 68, MT 92, KS 002 masuk dalam kelompok toleran dan MT 50, MT 89, KS 001 termasuk dalam kelompok peka (Tabel 5). Ketahanan kandidat mutan *seedless* terhadap penyakit CTV yang berbeda-beda ini mengakibatkan perlu dilakukan selektivitas pemilihan jenis akses yang ditanam di daerah yang endemis CTV. Selain itu perlu dikaji tentang berapa lama ketahanan kandidat mutan *seedless* ini terhadap serangan penyakit CTV secara alami.

KESIMPULAN DAN SARAN

Di lapang ditemukan tiga strain CTV berdasarkan gejala visual yang ditimbulkannya.

Ketahanan tanaman jeruk *seedless* hasil mutasi, hibridisasi, dan tetua indigenous terhadap penyakit CTV berbeda-beda dan dapat dikelompokkan ke dalam kelompok tahan, toleran, dan peka terhadap CTV. Akses resisten terhadap strain CTV parah (*severe strain*) adalah MT P2A6 dan MT P1A4, akses toleran terhadap strain CTV parah adalah MT 49, MT 52, MT 54, MT 68, MT 92, dan KS 002, serta akses yang peka terhadap strain ganas CTV adalah MT 50, MT 89, dan KS 001

DAFTAR PUSTAKA

1. Ayazpour, K, Sijam, K, Vadamalai, G & Jaafar, H 2011, 'Pomelo, a resistance variety to citrus tristeza virus in peninsular Malaysia', *International Conference on Biotechnology and Food Science IPCBEE*, vol.7 (2011) © (2011) IACSIT Press, Singapore.

2. Bar-Joseph, M, Garnsey, SM, Gonsalves, D, Moscovitz, M, Purcifull, DE, Clark, MF & Loebenstein, G 1979, 'The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus', *Phytopathology*, vol. 69, no. 2, pp. 190-4.
3. Bar-Joseph M, Marcus R & Lee RF 1989, 'The continuous challenge of citrus tristeza virus control', *Annual Review of Physiology*, vol. 27, hlm 291-316.
4. Bekolo, D, Zachee, A, Louis, BM & Akoa, A 2007, 'Discrimination of citrus tristeza virus (CTV) strains using Mexican lime/citrange Troyer combinations (*Citrus poncirus/Citrus trifoliata* x *Poncirus sinensis*)', *African Journal of Biotechnology*, vol 6, no. 4, pp. 375-8.
5. Cambra, M, Gorris, MT, Roman, MP, Terrada, E, Garnsey, SM, Camarasa, E, Olmos, A & Colomer, M 2000, 'Routine detection of citrus tristeza virus by direct immunoprinting ELISA method using specific monoclonal and recombinant antibodies', *Proceedings of the 14th Conference of IOCV, Brazil, IOCV Riverside*, pp. 34-41.
6. Clark, MF & Adam, AN 1977, 'Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses', *J. Gen. Virol.*, vol. 34, pp. 475-83.
7. Corazza-Nunes, MJ, Machado, MA, Stach-Machado, DR, Nunes, WMC, Carvalho, SA & Müller, GW 2006, 'Characterization of *Citrus tristeza virus* isolates from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) accessions of citrus active germplasm bank', *Summa Phytopathologica*, vol. 32, no.4, pp.322-7.
8. Chung, KR & Brlansky, RH 2009, '*Citrus diseases exotic to Florida: Citrus tristeza virus-stem pitting (CTV-SP)*', Fact Sheet PP-227, one of a series of the Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
9. Davino, S, Davino, M, Sambade A, Guardo, M & Caruso, A 2003, 'The first Citrus tristeza virus outbreak found in a relevant citrus producing area of Sicily, Italy', *Plant Disease*, vol 87, pp. 314.
10. Djelouah, K, Frasheri, D & D'Onghia, AM 2002, 'Serological diagnosis of citrus psorosis virus (CpsV) and citrus tristeza virus (CTV) using flower parts', *Proceeding of the 15th Conference of IOCV, Cyprus, IOCV Riverside*, pp. 363-5.
11. Dwiastuti, ME 1989, 'Penampakan gejala penyakit tristeza isolat kuat dan lemah dengan cantuman pada jeruk nipis', *Prosiding PFI*, 1989, Denpasar, hlm. 268-9
12. Dwiastuti, ME 1993, 'Citrus triteza virus (CTV) Strain and identification by monoclonal antibody', Paper presented in South East Asia Symposium on Biology and Control Crop Pathogens 2-4 February 1993., Bogor, Indonesia.
13. Dwiastuti ME & Triwiratno, A 1994a. 'Identifikasi strain lemah virus triteza jeruk (CTV) di Jatim, menunjang program imunisasi jeruk', *Prosiding Seminar Regional I PFI*, vol. IV, no. 3, hlm. 56-8.
14. Dwiastuti, ME & Triwiratno, A 1994b, 'Uji filterisasi isolat lemah CTV dengan tanaman indikator filter', *Prosiding Simposium Hortikultura Nasional, Malang*, 1994, hlm 529-34.
15. Dwiastuti, ME 2011, 'Simultaneous infection of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco.) with tristeza virus and liberobacter asiatus in Indonesia', *Proceeding the international Seminar on Natural Resources, Climate Change and Food Security Developing Countries-June 27-28-2011*, Book 1 Surabaya.
16. EPPO 2006, 'Citrus tristeza closterovirus'. Distributions map of quarantine pests for Europe
17. Garnsey, SM, Gottwald TR, Hilf ME, Matos L & Borbón J 2000, 'Emergence and spread of severe strains of *Citrus tristeza virus* isolates in the Dominican Republic', In: da Graça JV, Lee RF, Yokomi RK, eds., *Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. IOCV, Riverside, CA. pp.57-68.
18. Garnsey, SM, Civerolo EL, Gumpf, DJ, Paul, C, Hilf, ME, Lee, RF, Brlansky, RH, Yokomi, RK & Hartung, JS 2005, Biological Characterization of an International Collection of Citrus tristeza virus (CTV) Isolates Sixteenth IOCV Conference, 2005 Citrus Tristeza Virus, vol. 75, pp. 93.
19. Gottwald, T, Polek, M & Riley, K 2002, 'History, present incidence, and spatial distribution of *Citrus tristeza virus* in the California Central Valley', In: Duran-Vila N, Milne R G, da Graça J V, ed, *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, IOCV, Riverside, CA. pp. 83-94.
20. Hardiyanto, Supriyanto, A, Sugiyatno, A, Setiono, Mulyanto H, 2010. Panduan teknis seri 02: Teknologi produksi benih jeruk bebas penyakit. Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan buah Subtropika, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian, hlm. 62.
21. Liu, Y, Wang, G, Wang, Z, Yang, F, Wu, G & Hong, N, 2012, 'Identification of differentially expressed genes in response to infection of a mild *Citrus tristeza virus* isolate in *Citrus auratifolia* by suppression subtractive hybridization', *Scientia Horticulturae*, vol. 134, pp. 144-9.
22. Malandraki, I, Marouli, E & Varveri, C 2011, 'New isolates of *Citrus Tristeza Virus* naturally occurring in old lemon and mandarin trees in Greece', *New Disease Reports*, vol. 23, no. 2.
23. Martasari, C, Agisimanto, A & Yusuf, HM 2005, 'Pemuliaan mutasi tanaman jeruk keprok', *Prosiding Seminar Nasional Jeruk Tropika Indonesia*, Hlm. 140-9.
24. Moreno, P, Ambros S, Albiach-Marti MR, Guerri J, & Pena L 2008, '*Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry', *Molecular Plant Pathology*, vol. 9, pp. 251-68.
25. Muharam, A & Sulyo Y 1986, 'Imunisasi tanaman jeruk', *Bull. Penel. Hort.*, vol. 14, no. 2, hlm. 105-115.
26. Roesmiyanto, Dwiastuti, ME & Setyobudi, L 1986, 'Identifikasi gejala penyakit tristeza pada berbagai kultivar jeruk', *Bull. Penel Hort.*, vol. 14, no. 1 ed khusus. : 79-87.
27. Roistacher, CN 1991, 'Tristeza', in: Graft-transmissible diseases of citrus, *Handbook for detection and diagnosis*, FAO Publications Division, Rome, Italy, pp. 17-33.
28. Su, Hong-Ji 2008, 'Production and cultivation of virus-free citrus saplings for citrus rehabilitation in Taiwan', *Proceedings of FFTC-PPRI-NIFTS Joint Workshop on Management of citrus greening and virus diseases for the rehabilitation of citrus industry in the ASPAC*, Hanoi, Vietnam, 8-12 September 2008, Agricultural Publishing House, pp. 13-52.
29. Taufik, M, Hidayat, SH, Suseno, R & Susanto, S 2000, 'Uji ketahanan berbagai kultivar jeruk terhadap *Citrus tristeza virus*', *Hayati*, vol. 7, no. 3.
30. Timmer, LW, Garnsey, SM & Graham, JH 2000, *Compendium of citrus diseases*, APS Press, St Paul, MN.
31. Zhou, Y, Chang-Yong, Z, Zhen, S, Ke-hong, L & Fang-Yun, Y 2007, 'Characterization of Citrus tristeza virus isolates by indicators and molecular biology methods', *Agric.Sci.In China*, vol. 6, no. 5, pp. 573-9.