

## TEMUAN PENYAKIT BARU

### Penyakit Mosaik pada Koro Pedang

#### Mosaic Disease on Jack Bean

Tri Asmira Damayanti\*

Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

#### ABSTRAK

Gejala mosaik khas infeksi virus ditemukan pada pertanaman koro pedang di Dramaga Bogor baru-baru ini. Gejala mosaik terlihat jelas pada daun muda berupa warna hijau muda dan tua, beberapa tanaman menunjukkan gejala penebalan tulang daun. Pada daun yang lebih tua gejala tidak terlihat jelas. Deteksi serologi menggunakan antiserum *Bean common mosaic virus* (BCMV) memberikan reaksi positif, namun deteksi dengan teknik *reverse transcription polymerase chain reaction* menggunakan primer spesifik gen protein selubung BCMV strain *black eye* (BIC) tidak memberikan hasil positif. Fragmen DNA berhasil teramplifikasi ketika digunakan primer universal gen protein selubung (CP) *Potyvirus* dan *degenerate primer* gen *cylindrical inclusion* (CI) *Potyvirus*. Analisis DNA menunjukkan homologi tertinggi (86.4–91.5%) dengan isolat-isolat BCMV asal beberapa tanaman dari negara lain berdasarkan sikuen sebagian gen protein selubung, sedangkan berdasarkan sikuen sebagian gen CI memiliki homologi tertinggi (87.3%) dengan BCMV-RU1-P. Temuan ini merupakan laporan pertama infeksi BCMV pada koro pedang di Bogor, Jawa Barat, Indonesia

Kata kunci: *Bean common mosaic virus*, *cylindrical inclusion*, *Potyvirus*, protein selubung

#### ABSTRACT

Recently, a mosaic disease was observed on jack bean cultivation in Dramaga, Bogor, West Java. The symptom on infected plants, i.e. combination of pale and dark green area was more obvious on young leaves. Vein banding, leaf malformation, and growth inhibition was also observed in infected plants. The symptom was not very obvious in older leaves. Serological detection gave positive reaction to *Bean common mosaic virus* (BCMV) antiserum, but reaction was negative when detected using specific primer to coat protein (CP) of BCMV strain *black eye* by *reverse transcription polymerase chain reaction*. DNA fragments were successfully amplified by RT-PCR using universal primer of CP gene and degenerated primer for cylindrical inclusion gen (CI) of *Potyvirus*. DNA analysis showed the highest homology (86.4–91.5%) to several isolates of BCMV-infecting different crops from several countries based on partial sequence of CP, whereas based on partial sequence of CI the highest homology (87.3%) was to BCMV-RU1-P. This is the first report of BCMV infection on jack bean in Bogor, West Java, Indonesia.

Key words: *Bean common mosaic virus*, coat protein, cylindrical inclusion, *Potyvirus*

\*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Jalan Kamper, Bogor 16680  
Tel: 0251-8629364, Faks: 0251-8629362, Surel: [triasmiradamayanti@gmail.com](mailto:triasmiradamayanti@gmail.com)

Koro pedang (*Canavalia ensiformis*) merupakan salah satu tanaman kacang-kacangan yang prospektif dibudidayakan secara luas. Tanaman ini berasal dari Amerika Selatan dan Tengah. Koro pedang memiliki kandungan nutrisi yang setara dengan kedelai, sehingga dapat dijadikan alternatif bahan pembuat tempe (Litbang Deptan 2014).

Sekitar April 2014 ditemukan infeksi virus dengan gejala mosaik di pertanaman koro pedang di kebun percobaan Leuwikopo IPB, Dramaga, Bogor, Jawa Barat. Gejala berupa campuran warna daun hijau muda dan tua dengan batas yang jelas (Gambar 1a). Selain mosaik, juga terlihat gejala penebalan tulang daun (*vein banding*), malformasi daun dan pertumbuhan tanaman terhambat. Gejala mosaik lebih jelas terlihat pada daun pucuk dibandingkan dengan daun yang lebih tua. Insidensi penyakit di pertanaman ialah sekitar 20% pada saat pengamatan dilakukan. Deteksi serologi dan deteksi asam nukleat dengan *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) dilakukan untuk mengetahui identitas virus penyebab penyakit mosaik tersebut.

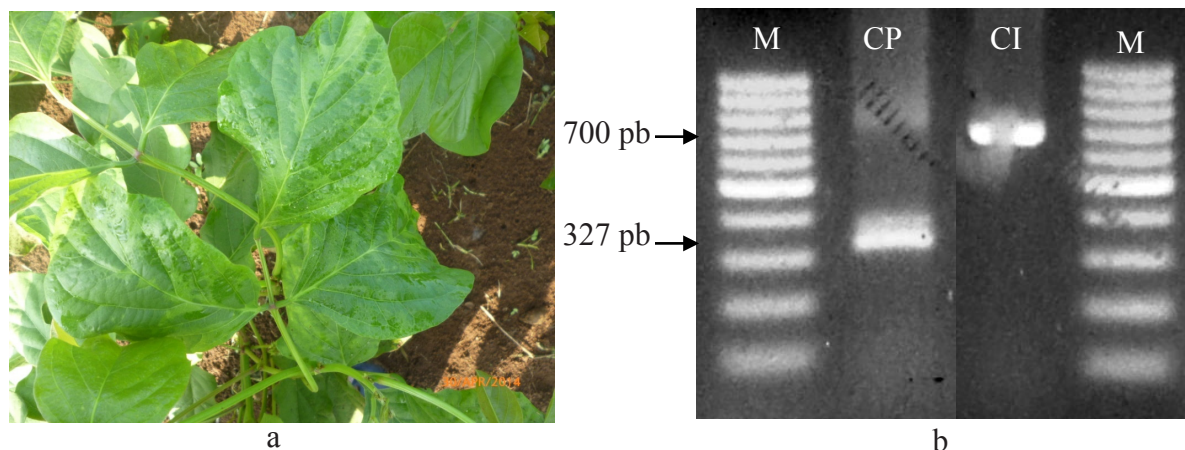
Deteksi serologi dilakukan terhadap tanaman bergejala dengan menggunakan antiserum spesifik *Bean common mosaic virus* (BCMV) dengan metode ELISA tidak langsung (*Indirect* ELISA) yang dilakukan sesuai dengan protokol pembuat antiserum (Agdia). RT-PCR diawali dengan tahap ekstraksi RNA total dari tanaman bergejala menggunakan GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit dengan protokol sesuai yang direkomendasikan oleh pembuatnya (Thermo Scientific). Tahap sintesis cDNA dilakukan dengan komposisi pereaksi terdiri atas 3  $\mu$ L RNA total, 10 mM primer d(T) 1  $\mu$ L, 10 mM dNTP 0.5  $\mu$ L, dan 1.5  $\mu$ L air bebas nuklease, dicampur hingga homogen, kemudian dipanaskan pada suhu 65 °C selama 5 menit, dan langsung didinginkan di dalam es. Setelah dingin, ditambahkan 2  $\mu$ L 5x bufer transkripsi balik, 1  $\mu$ L 0.1 M DTT, 0.5  $\mu$ L enzim M-MuLV Revertaid (200 UL<sup>-1</sup>) (Thermo Scientific), 0.5  $\mu$ L RNase inhibitor Ribolock (40 UL<sup>-1</sup>) (Thermo Scientific), dan

diinkubasi pada suhu 42 °C selama 60 menit. Amplifikasi cDNA menggunakan 3 pasang primer secara terpisah, yaitu primer spesifik gen protein selubung (CP) BCMV galur *black eye cowpea* (BIC), primer universal gen CP *Potyvirus* (MJ1/MJ2), dan primer degenerate gen *cylindrical inclusion* (CI) *Potyvirus* (CiFor dan CiRev) dengan program amplifikasi berturut-turut mengikuti Anggraini dan Hidayat (2014), Marie-Jeanne *et al.* (2000), dan Ha *et al.* (2008). Fragmen DNA hasil amplifikasi diseparasi pada 1% gel agarosa yang dilarutkan dalam 0.5x bufer TBE dan mengandung 1% peqgreen. Elektroforesis menggunakan 0.5x bufer TBE selama 45 menit pada tegangan 50 volt. Visualisasi DNA dilakukan dibawah UV transiluminator dan didokumentasi dengan kamera digital.

Perunutan DNA produk RT-PCR dilakukan dengan mengirim sampel ke First Base, Malaysia. Analisis homologi sikuen nukleotida gen CP dan CI dilakukan menggunakan *software* ClustalW BioEdit yang dikalkulasi dengan pilihan "*sequence identity matrix*". Pohon filogenetika dibuat dengan *software* MEGA v6.06 dengan metode *neighbor-Joining* dan *Kimura-2 parameter model* untuk estimasi jarak. Nilai *bootstrap* yang digunakan sebanyak 1000 kali.

Semua sampel tanaman bergejala menunjukkan reaksi positif terhadap antiserum BCMV (Tabel 1), namun RT-PCR menggunakan primer spesifik gen CP BCMV-BIC menunjukkan hasil negatif (data tidak ditampilkan). Fragmen DNA berhasil diamplifikasi dengan primer universal gen CP *Potyvirus* dan primer degenerate gen CI *Potyvirus* dengan ampikon berturut-turut berukuran 327 pb dan 700 pb (Gambar 1b). Hasil deteksi ini menunjukkan bahwa penyebab mosaik koro pedang ialah virus dari genus *Potyvirus* dan bukan BCMV strain BIC walaupun menurut Morales dan Bos (1988) koro pedang merupakan salah satu inang BCMV.

Virus yang pernah dilaporkan menginfeksi koro pedang antara lain ialah *Canavalia mosaic potyvirus* di Nigeria (Taiwo, 2003), *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CaBMV)



Gambar 1 a, Gejala mosaik pada daun koro pedang; b, Amplifikasi DNA menggunakan primer universal gen CP dan primer degenerate gen CI *Potyvirus*. M, penanda DNA 100 pb (Thermo Scientific).

Tabel 1 Hasil deteksi serologi daun koro pedang bergejala mosaik menggunakan antiserum *Bean common mosaic virus* (BCMV)

Sampel	Rerata Nilai Absorbansi ELISA (NAE)*	Reaksi
Bufer	0.061	-
Tanaman sehat (Kontrol negatif)	0.070	-
Kacang panjang terinfeksi BCMV (Kontrol positif)	1.973	+
Koro pedang 1	2.242	+
Koro pedang 2	2.076	+
Koro pedang 3	1.977	+
Koro pedang 4	0.815	+

\*Hasil ELISA dinyatakan positif jika  $NAE \geq 0.122$

(CPC 2007), dan *Tobacco mosaic virus* (TMV) di Venezuela (Marys *et al.* 2004), *Canavalia maritima mosaic potyvirus* (CnMMV) dan *Sword bean distortion mosaic potyvirus* (SBDMV) (ICTVd 2006; Plant Virus Online 1996). Ada hubungan serologi antara SBDMV dengan BCMV, *bean yellow mosaic virus* (BYMV), *peanut mottle virus* (PeMV), *soybean mosaic virus* (SMV) dan *watermelon mosaic virus 2* (WMV 2) (Plant Virus Online 1996). CaBMV juga dilaporkan menginfeksi secara alami *C. rosea* (*beach bean*) di Brazil (Kitajima *et al.* 2008).

Analisis sikuen nukleotida sebagian gen CP menunjukkan homologi 86.4–91.5% dengan beberapa isolat BCMV, yaitu isolat MS1, PV0915, CD013, HB, CT, RU1-P, NL1, PStV-JX14, dan PStV (Tabel 2). Homologi dengan SMV dan BYMV berturut-turut 80.4% dan 66.8%, keduanya merupakan anggota

*Potyvirus*. Dalam analisis ini keduanya digunakan sebagai pembanding selain BCMV.

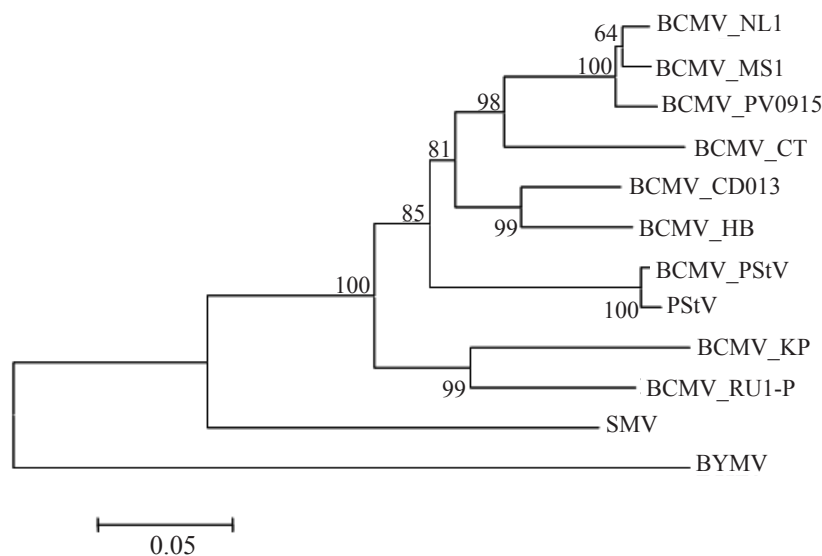
Identitas spesies dalam genus *Potyvirus* dapat lebih spesifik ditentukan berdasarkan homologi nukleotida gen CI (Ha *et al.* 2008). Homologi tertinggi sebagian gen CI BCMV isolat koro pedang (BCMV-KP) adalah terhadap BCMV-RU1-P (87.3%) dan terendah terhadap BYMV (63.9%) (Tabel 2). Lebih lanjut, analisis filogenetika mendukung hubungan kekerabatan BCMV-KP dengan BCMV-RU1-P yang ditunjukkan dengan nilai *bootstrap* 99% (Gambar 2).

Hasil deteksi dengan antiserum dan identifikasi gen CP dan CI menunjukkan bahwa penyebab mosaik pada tanaman koro pedang di Bogor adalah BCMV. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mempelajari lebih lengkap karakter virus.

Tabel 2 Analisis homologi nukleotida sebagian gen protein selubung (CP) dan gen *cylindrical inclusion* (CI) *Bean common mosaic virus* (BCMV) isolat koro pedang

Isolat virus	Nomor aksesi GenBank	Asal tanaman inang	Homologi gen CP (%)	Homologi gen CI (%)
BCMV-RU1-P	KF919300.1	Tidak diketahui	91.2	87.3
BCMV-CD013	KM051430.1	Kedelai	91.5	82.6
BCMV-NL1	KM023744.1	Buncis	91.2	81.5
BCMV-PV0915	HG792064.1	Buncis	91.5	81.4
BC -CT	KM076650.1	<i>Cudrania tricuspidata</i>	91.5	81.2
BCMV -HB	KC478389.1	Hyacinth bean	90.9	81.1
BCMV -MS1	EU761198.1	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	90.3	80.5
BCMV-PSStV-JX14	KJ807813.1	Kedelai	86.7	80.5
PSStV	U05771.1	Tidak diketahui	86.4	80.5
SMV*	NC_002634.1	Kedelai	80.4	74.3
BYMV*	NC_003493.1	Tidak diketahui	66.8	63.9

\* Sebagai pembandingan di luar grup. SMV, *Soybean mosaic virus*; dan BYMV, *Bean yellow mosaic virus*.



Gambar 2 Analisis filogenetika BCMV isolat Koro Pedang (BCMV\_KP) terhadap isolat lainnya. Pohon filogenetika dibuat dengan software MEGA v6.06 berdasarkan ClustalW alignment sikuen BCMV\_KP dan isolat lainnya. Nilai *bootstrap* yang digunakan 1000 kali. Garis pada bagian kiri bawah 0.05 menunjukkan *nucleotide change per site*. SMV dan BYMV digunakan sebagai pembandingan diluar grup.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Anggraini S, Hidayat SH. 2014. Sensitivitas metode serologi dan *polymerase chain reaction* untuk mendeteksi *Bean common mosaic potyvirus* pada kacang panjang. J Fitopatol Indones. 10(1): 17–22. DOI: <http://dx.doi.org/10.14692/jfi.10.1.17>.
- [CPC] Crop Protection Compendium. 2007. *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CaBMV). United Kingdom (UK): CABI.
- Ha C, Coombs S, Revill PA, Harding RM, Vu M, Dale JL. 2008. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of Potyviruses. Arch Virol. 53(1):25–36. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-007-1053-7>.
- ICTVd. 2006. *Canavalia maritima mosaic* (?) Potyvirus (CnMMV). [www.ICTVdb.bio-](http://www.ICTVdb.bio-)

- mirror.cn/ICTVdB/00.057.0.81.013.htm [diunggah 25 Nov 2014]
- Kitajima EW, de Alcantara, Madureira PM, Zerbini PA, Rejende JAM, Zerbini FM. 2008. A mosaic of beach bean (*Canavalia rosea*) caused by an isolate of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) in Brazil. Arch Virol. 153(4):743–747. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-008-0052-7>.
- Litbang Deptan. 2014. Koro pedang (*Canavalia ensiformis*) mampu dampingi kedelai. [www.pascapanen.litbang.deptan.go.id/index.php/en/berita/257](http://www.pascapanen.litbang.deptan.go.id/index.php/en/berita/257) [diunggah 25 November 2014]
- Marie-Jeanne V, Ioos R, Peyre J, Alliot B, Signoret P. 2000. Differentiation of *Poaceae* Potyviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction analysis. J Phytopathol. 148:141–151. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0434.2000.00473.x>.
- Marys E, Ortega E, Carballo O. 2004. Natural Infection of *Canavalia ensiformis* with *Tobacco mosaic virus* in Venezuela. Plant Dis. 88(6):681.3. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.6.681C>.
- Morales FJ, Bos L. 1988. *Bean common mosaic virus*. [www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno+337#host](http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno+337#host) [diunggah 25 Nov 2014].
- Plant Virus Online. 1996. Swordbean distortion mosaic potyvirus (SBDMV). [www.pvo.bio-mirror.cn/descr136.htm](http://www.pvo.bio-mirror.cn/descr136.htm) [diunggah 25 Nov 2014]
- Taiwo MA. 2003. Viruses infecting legumes in Nigeria: case history. Di dalam: Jacqueline d'A Hughes, Babajide O. Odu, Editor, *Plant Virology in sub-Saharan Africa*. Oyo State (NG): IITA. hlm 365–380.