

ARTIKEL REVIEW: DIAGNOSIS PENYAKIT TUNGRO PADA PADI

Ayu Lestiyani*

Program Studi S1 Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Tidar

Email : ayu.lestiyani@untidar.ac.id

Abstract

Tungro is one of the most important and devastating diseases in world agriculture. Tungro is caused by two types of viruses, namely rod viruses and round viruses. Stem virus is also called Rice Tungro Bacilliform Virus (RTBV) and round virus is called Rice Tungro Spherical Virus (RTSV). The spread of the tungro virus can only be done by green leafhoppers from inoculum sources containing both viruses can transmit RTSV and RTBV simultaneously. Molecular diagnosis is necessary for early detection of both viruses. Several methods such as DNA fingerprinting, restriction analysis, southern blot hybridization and sequencing have been used to detect the presence of RTSV and RTBV. Susceptible rice varieties tend to have higher disease development than resistant varieties.

Keywords: Molecular diagnosis, Rice, Tungro

PENDAHULUAN

Tungro disebabkan oleh dua jenis virus yaitu virus batang (*rice tungro bacilliform virus*=RTBV) dan virus bulat (*rice tungro spherical virus*=RTSV). Kedua jenis virus tersebut hanya dapat ditularkan oleh wereng hijau secara semipersisten. RTBV merupakan virus dependen, sedangkan RTSV sebagai virus pembantu (*helper virus*). Wereng hijau dapat menularkan RTSV dan RTBV secara bersamaan dari sumber inokulum yang mengandung kedua virus. Penularan RTBV hanya terjadi apabila vektor telah menghisap RTSV terlebih dahulu, sedangkan penularan RTSV dapat terjadi tanpa bantuan RTBV (Sumardiyono *et al.*, 2004; Tiongco *et.al.*, 1993).

RTBV merupakan salah satu anggota dari genus Badnavirus dan termasuk dalam famili Caulimoviridae. Virion RTBV berdiameter 35 x 150-350 nm dan panjang 100-300 nm (Hibino *et al.*, 1978). Genom RTBV adalah circular double stranded DNA (dsDNA), berukuran sekitar 8kbp dan terdiri dari empat open reading frames (ORFs) yang mengkode empat protein antara lain P1, P2, P3, P4 (Hull, 1996). P2 berperan dalam pengikatan asam nukleat. Viabilitas RTBV berkorelasi dengan kemampuan P2 untuk berinteraksi dengan CP dan P2 berperan dalam proses kapsidasi (Herzog *et al.*, 2000).

RTSV merupakan anggota dari genus Waikavirus dan termasuk dalam famili Sequiviridae. Virion RTSV berbentuk isometrik berdiameter sekitar 30

nm. Genom RTSV adalah positive single stranded RNA (++ssRNA) dan mempunyai sekuen poly(A) pada ujung 3' (Perin and Hull, 1999). Genom RTSV berukuran sekitar 12 kbp, terdiri dari satu ORF besar yang mengkode protein berukuran sekitar 390 kDa (Shen *et al.*, 1993), dan dua ORF kecil pada ujung 3' yang mengkode protein berukuran 5-10 kDa. Genom RTSV terdiri dari beberapa gen fungsional dalam coding region yaitu CP1, CP2, CP3, nucleotide triphosphate (NTP), protease (PRO) dan polymerase (POL) (Thole and Hull, 1996).

DIAGNOSIS MOLEKULAR

Molekular memberikan pemahaman lebih baik pada variasi virus tungro. Dua starin RTBV dari India dan Asia Tenggara menggunakan analisis restriksi, southern blot hibridisasi dan squensing. Mikrovariasi RTBV ada pada tingkat lapangan dan terlihat bahwa single isolat RTBV tercampur dengan variant lain. Metode DNA fingerprint digunakan untuk membedakan 4 variant biologi pada RTBV dan digunakan untuk memperlihatkan perbedaan populasi RTBV di lapangan serta geografik daerah endemik tungro di Filipina (Azzam *et al.*, 2000).

Jones *et al.*, (1991) membedakan virus RTBV dan RTSV. Metode yang dilakukan pertama adalah pemurnian virus, daun yang terinfeksi dibekukan menggunakan nitrogen cair, ditumbuk, dan

dilunakkan menggunakan 4 ml 0,1 M-sodium citrate pH 5-9. Celluclast (Novo enzim) ditambahkan 5% dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu 30°C kemudian dicentrifuge dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit (Sorvall GSA rotor). Pelet yang dihasilkan diresuspensi dengan citrate buffer 2 ml dan 5% celluclast, reinkubasi selama 1 jam pada suhu 30°C dan centrifugasi. Supernatan dipisahkan dan ditambahkan polyethylen glycol 6000, NaCl 7% 0,2 M dan Triton X-100 1% . Inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang, resuspensi dengan 2 ml citrat buffer dan dicentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit. Pelet ditambah 5% sucrose cushion dan centrifuge dengan kecepatan 36 000 rpm selama 2-5 jam (beckman Ti40 rotor) 4°C. Pelet yang dihasilkan diresuspensi pada 0,04 ml citrate buffer dan diharapkan mengandung RTSV dan RTBV.

Pengujian viral coat protein dilakukan dengan cara, partikel virus dipanaskan pada suhu 90°C di Laemml sample buffer (62,5mM-Tris-HCL pH 6-8, 2% SDS, 110% glycerol, 5% 2-mercapthoetanol, 0.001% bromophenol blue) dan coat protein dipisahkan dengan elektroforesis menggunakan 15% polyacrylamide gels containing SDS. Protein dideteksi dengan pewarnaan menggunakan Coomassie blue atau immunoglobuling (Jones *et al.*, 1991).

Coomassie blue menandai gel yang bersisi coat protein RTSV (Fig. 1a, lane 1) yang memperlihatkan predominat bands (Mr 35K dan 26 K) dan minor band 37 K. Masing-masing direaksikan dengan RTSV antiserum pada immunoblots baik individually prepared virus ataupun unfractionated virus (1b, lane 1). Terlihat tidak ada reaksi silang antara RTSV dan

RTBV dan respective antiseranya (Fig 1b, lane 2) dan tidak ada reaksi antara antisera dan tanaman sehat. Preparasi dengan kemurnian RTBV tinggi selalu memperlakukan untuk SDS-PAGE dan mayor protein band 37K dan 33K dideteksi dengan Coomassie blue staining (Fig 1a, lane 2).

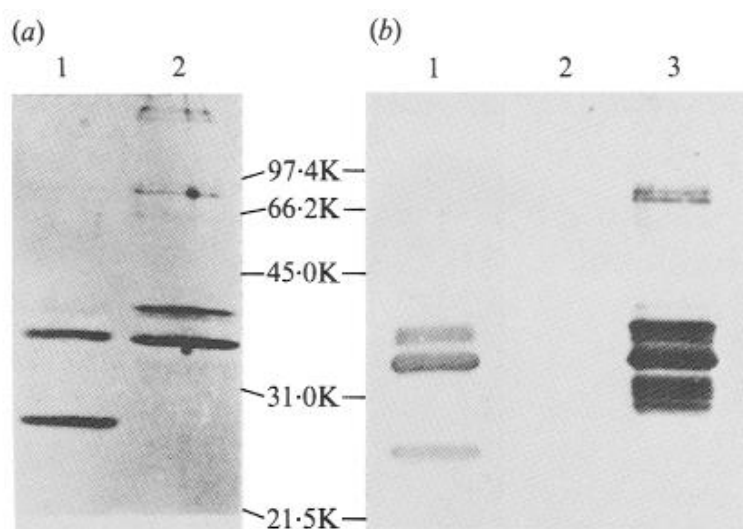


Fig. 1. Characterization of RTSV and RTBV coat proteins by gel electrophoresis. The viruses were purified individually (Cabauatan & Hibino, 1988), then dissociated and electrophoresed as described in Methods. (a) Gel stained in Coomassie blue: lane 1, RTSV; lane 2, RTBV. (b) Immunoblot: lane 1, RTSV probed with RTSV antiserum; lane 2, RTSV probed with RTBV antiserum; lane 3, RTBV probed with RTBV antiserum. The M_r s shown are from unstained protein markers from Bio-Rad.

Immunoblotting memperlihatkan reaksi pada protein bands (Fig 1b lane 3) (Jones *et al*, 1991). Pengujian dengan Southern blot hybridization, PCR murni yang telah dipisahkan oleh gel elektroforesis, diblotkan pada Hybond-Nnylon membran (Amersham) dan cross-linked pada membran dengan irradiasi UV. ^{32}P -dCTP-labelled DNA probes disiapkan dari

product PCR murni menggunakan Kit Oligolabelling (Pharmacia), Membran menjadi subjek dengan pencucian high stringency menggunakan 6 X SSC + 0,5% SDS, 1 X SSC + 0,5% SDS, dan 0,1 X SSC + 0,5% SDS pada suhu 65°C. Kemudian membran dikeringkan dan ekspose ke x-ray film pada suhu -70°C lebih dari 30 menit (Zhang *et al.*, 1997).

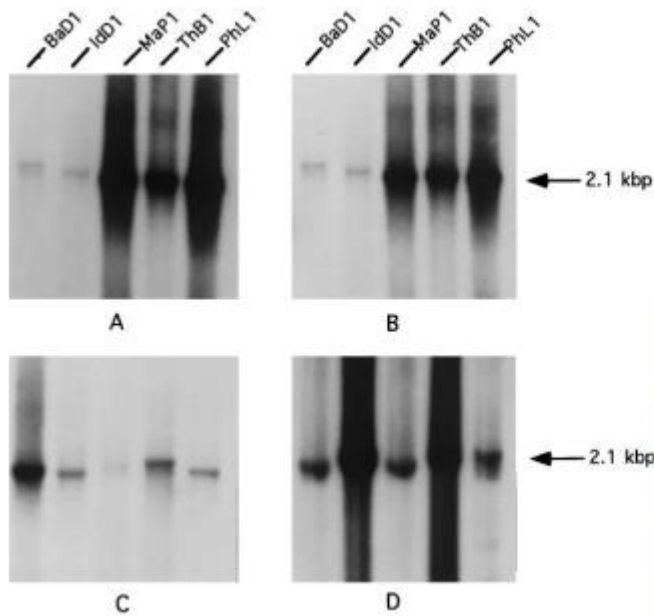


Fig. 2. Southern blot hybridization of the CP gene cDNA fragments (indicated by arrows) from isolates BaD1, IdD1, MaP1, ThB1 and PhL1 (marked on the top), probed with the ³²P-labelled CP gene fragments from the isolates of PhL1 (A), MaP1 (B), BaD1 (C), and IdD1 (D)

Strand cDNA terlihat pada isolat Bad1,, IdD1 MaP1, PhL1 dan ThB1 dengan menggunakan primer V1084 yang digunakan dalam PCR dengan pasangan primer (5'+3') V753 + V762 untuk CP1, V763 + V764 untuk CP2, V765 + V754 untuk CP3, dan V753 + V754 untuk CP1-3. Pada Southern blot analisis ditemukan 2,1 kbp cDNA fragmen dari isolat yang diperiksa dengan ³²P-labelled dari masing-masing isolat atau dari masing-masing tiga fragmen CP individu PhL1 isolat (Fig. 2). Gambar A dan B menunjukkan bahwa isolat PhL1 dan MaP1 memberikan reaksi yang sama, hibridisasi yang kuat untuk fragmen 2,1 kbp dari isolat MaP1 dan Phli, kurang kuat dengan yang dari isolat ThB1, dan lemah pada isolat Bad1 dan IdD1. Ketika Bad1 digunakan sebagai probe, sinyalnya adalah Bad1> ThB1> IdD1> PhL1> MaP1 (Fig. 2C). Dengan probe dari isolat IdD1, fragmen 2,1 kbp dari isolat

IdD1 dan ThB1 terlihat hibridisasi kuat namun yang berasal dari isolat Bad1, MaP1 dan PhL1 kurang kuat (Gambar 2D). Ketika probe fragmen gen CP individu dari PhL1 isolat yang digunakan, tidak ada perbedaan yang jelas antara tiga probe (Zhang *et al.*, 1997).

Penelitian Nath *et al.* (2002) menjelaskan mengenai analisis molekular RTBV dari India. Virus didapatkan dari lahan percobaan di Bidhan Chandra Krishi Viswavidyalaya, Kalyani, West Bengal (WB isolate) dan dari glasshouse Directorate of Rice Research, Hyderabad, Andhra Pradesh (AP isolate). Kloning DNA RTBV menggunakan crude virus atau total DNA tanaman yang terinfeksi. Preparasi crude virus menggunakan metode Jones *et al.*, 1991. Viral DNA diolah untuk penyelesaian dengan sejumlah enzim restriksi dan kloning baik dalam pUC18 atau pBluescript SK(+/-), dengan

menggunakan prosedur standar. Hal yang sama digunakan untuk mendapatkan klon RTBV dari total DNA yang diisolasi dari tanaman terinfeksi. Klon tersebut dipilih dalam hibridisasi dengan probe radioaktif yang mewakili Phil1 pada klon pRTBV101. Identitas klon dikembangkan dengan membuat map restriksi dan memeriksa susunan fragmen dari hibridisasi dengan fragmen tetap pRTBV101.

Kloning dan analisis restriksi pada RTBV DNA India dengan isolat WB dan AP. Beberapa RTBV-specific klon pada isolat WB dari *screening* crude virus menggunakan RTBV-specific radioactive probe. Satu clone yang ditemukan memiliki sisipan ukuran dari 8,0 kb dengan menggunakan BamHI dan diberi nama pRTBV203. Beberapa klon cross-hibridisasi lain untuk pRTBV203 juga diperoleh dan terlihat memiliki ukuran sekitar 4,0 kb. pRTBV203 diasumsikan mewakili genom RTBV lengkap, berdasarkan ukurannya. Untuk isolat AP, sekitar 1000 klon yang mewakili tungro terinfeksi DNA padi discreening dengan probe, dipilih dua, yang pada analisis yang terlihat memiliki ukuran 6,5 kb dan 1,5 kb dengan ClaI. Hal ini merupakan restriksi map dan telah dikonfirmasi oleh hibridisasi dengan fragmen pRTBV101, yang mewakili Phil1. Kemudian klon diberi nama pRTBV204 dan pRTBV205, masing-masing ditemukan berdekatan satu sama

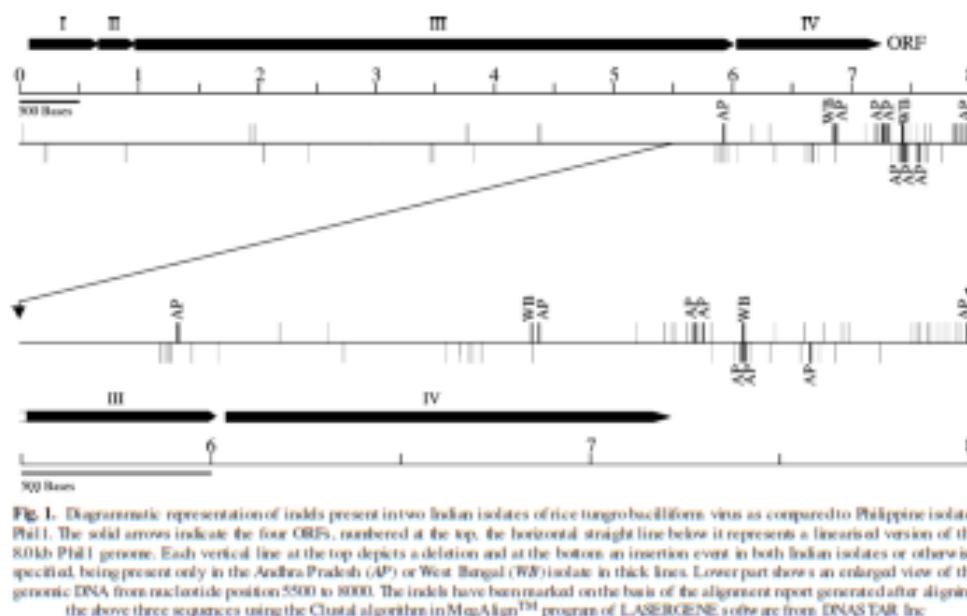
lain ketika *sequence* bagian dalam dibandingkan dengan Phil1 dan isolat WB full-length. Disimpulkan bahwa, pRTBV204 dan pRTBV205, bersama-sama mewakili urutan lengkap dari isolat AP. Asumsi ini diperkuat dengan menganalisis klon tambahan dari tanaman terinfeksi yang sama, yang menunjukkan pembatasan dan pola hibridisasi bahwa dua klon bersebelahan. Restriksi map menggunakan dua belas enzim restriksi dibangun dari kedua genom dan dibandingkan dengan Phil1. Sejumlah perbedaan terlihat tidak adanya SalI, SacI dan SphI di kedua isolat India dan tidak adanya BamHI pada isolat AP. Selain itu, ada perbedaan dalam jumlah restriksi dalam BstXI, BglIII, ClaI, EcoRI, HindIII, KPNI dan XhoI antara kedua isolat India (Nath, 2002).

Kombinasi *nested deletions* dan primer walking digunakan untuk menurunkan *sequence* klon RTBV lengkap. Daerah ambiguitas diselesaikan oleh *sequencing repeated*. Sequencing dikumpulkan dan dianalisis menggunakan Jotun Hein atau Clustal algorithm dari MegAlignTM program perangkat lunak LASERGENE dari DNASTAR Inc. pada pengaturan default. *Sequence* DNA disimpan dalam EMBL Sequence Database dan diberi nomor akses: AJ292232 (AP isolat) dan AJ314596 (WB isolat) (Nath, 2002).

Panjang total isolat WB, diwakili oleh pRTBV203, 7934 bp dan isolat AP, diwakili oleh pRTBV204 dan pRTBV205, 7907 bp. WB memiliki komposisi nukleotida A 40,5%, C 16,1%, G 18,1% dan T 25,2% pada strand positif. Sedangkan AP A 40,8%, C 16,0%, G 17,9% dan T 25,1%. *Squencing* dengan Phil1 menunjukkan bahwa ada sekitar 2.000 nukleotida substitusi, terutama di daerah antargen pada isolat India, sedangkan, di antara keduanya, hanya ada 372. Ada 77 lokasi di mana penyisipan/penghapusan (indels) yang terdeteksi antara isolat India dan Phil1, mayoritas yang terletak di daerah antargen (Fig 1). Dari yang terletak di daerah coding, mayoritas berada dalam kelipatan tiga nukleotida, yang tidak mempengaruhi reading frame. Sebagian besar indels pada daerah intergenik yang terlibat nukleotida tunggal. Salah satu fitur utama adalah penghapusan dari 30 residu nukleotida di isolat AP setelah posisi 5912. Penomoran dari residu nukleotida dilakukan sesuai dengan sequence RTBV. Penataan ORFs, dengan jumlah empat, baik di isolat sama dengan urutan RTBV lainnya, meskipun sejumlah nukleotida berubah. Gambar 2 mengilustrasikan hubungan filogenetik di ORFs I, II, dan III di tingkat asam amino antara kedua sequence India dan telah tersedia di database dengan menggunakan Jotun Hein algorithm. Seperti ORF IV hanya ada dalam RTBV.

Hal ini sangat jelas bahwa kluster sequence India memiliki hubungan terkuat dengan Phil1 (Nath, 2002).

Kodon non-konvensional, ATT pada posisi 98, coding untuk asam amino isoleusin merupakan awal ORF I seperti yang ditunjukkan oleh sequence alignment. ORF dihentikan pada posisi 670, mirip dengan Phil1. Isolat India menunjukkan nukleotida dan identitas asam amino sekitar 78% dan 79% dengan isolat Phil1. Diantaranya, dua isolat India memiliki angka yang sesuai 96,7% dan 99,5%. Keduanya memiliki penyisipan residu histidin pada posisi 38 dari 190 protein asam amino. Dari total 40 substitusi asam amino di isolat India, kecuali satu yang identik dengan keduanya, melibatkan 16 perubahan dalam muatan residu (Nath, 2002). ORF II dimulai pada posisi 667 dan berlanjut sampai 1002, coding untuk memperkirakan 111 asam amino, yang lebih dari Phil1. Identitas nukleotida dan asam amino sekitar 81,5% dan 87% yang ditemukan antara kedua isolat India dan Phil1. Antara dua isolat India, memiliki angka yang sesuai 97,3% dan 100%. Keduanya menunjukkan penyisipan residu serin pada posisi 82 dari protein ini. *Squencing* konsensus PKKGIKRYKYP, diamati pada banyak anggota dari genus Badnavirus dan RTBV yang dikenal lainnya juga ada di kedua isolat (Nath, 2002).



ORF III dimulai pada posisi nukleotida 999. Dalam isolat WB, terminated pada posisi 6023, namun di isolat AP titik akhir itu bergeser ke posisi 5993 karena penghapusan 30 residu yang mengikuti posisi 5912. ORF III menunjukkan pembentukan suatu poliprotein, disebut P194, coding untuk perkiraan 1675 residu asam amino dalam Phil1, dengan domain yang berbeda untuk protein mantel (CP), aspartat protease (PR) dan reverse transcriptase/ribonuklease H (RT/RNase H). Selain itu, bagian terminal amino menunjukkan kesamaan dengan gerakan virus beberapa protein. Dengan demikian, sequence dari isolat India ini ORF dianalisis antar daerah yang dinyatakan sebagai protein fungsional yang batasannya sudah ada. Isolat WB dikodekan dengan

poliprotein dari 1674 residu asam amino sedangkan, isolat AP dikodekan 1.664 residu asam amino pada P194.

Pada ORF III, keseluruhan asam nukleat dan identitas asam amino 78,8% dan 80,5% isolat WB dan 78,5% dan 80,2% isolat AP, dibandingkan dengan sequence Phil1. Identitas terendah berada di wilayah PR, di mana kedua isolat India menunjukkan hanya sekitar 69,2% dan 65,2% identitas pada tingkat nukleotida dan asam amino, sedangkan diantaranya, angka tersebut 96,1% dan 99,1% pada masing-masing. Sisa domain menunjukkan angka yang konsisten sekitar 84,0% dan 88,7% pada level asam amino dan nukleotida, sedangkan diantaranya, empat domain sama-sama identik sekitar 96% dan 99% pada masing-masing (Nath, 2002).

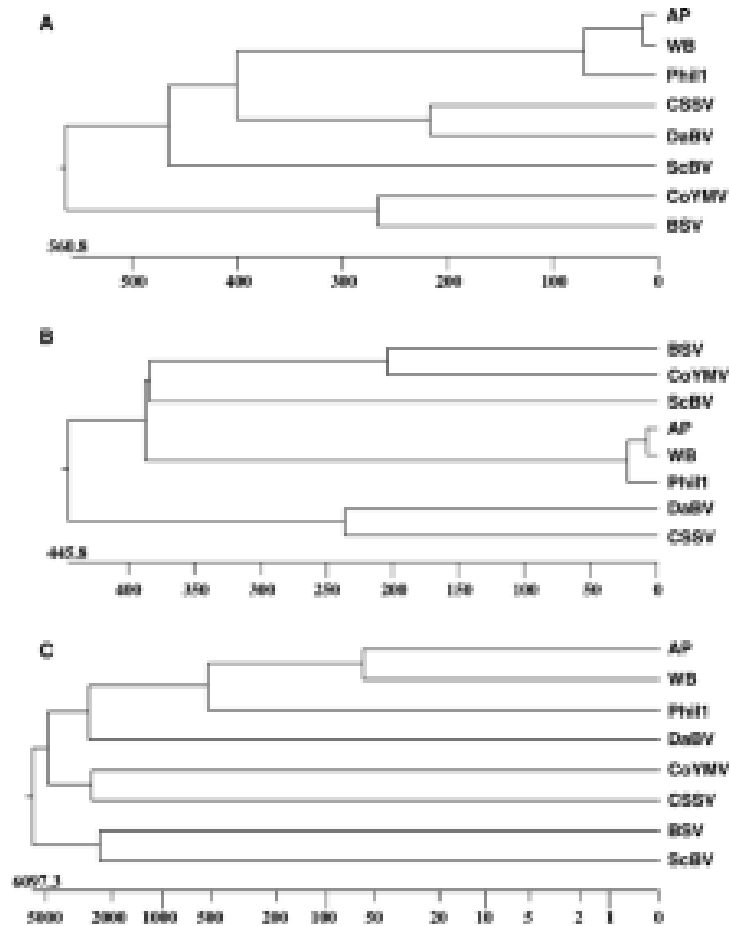


Fig. 2. Phylogenetic analysis of amino acid sequences encoded by ORPs between rice tungro bacilliform virus Andhra Pradesh (AP), West Bengal (WB) and Philippines (PhilI) isolates with members of genus Badnaviruses. **A** Phylogenetic tree of ORP1, **B** Phylogenetic tree of ORP3, **C** Phylogenetic tree of ORP2. The analysis was done using Jukes-Hain algorithm in MegAlign™ program of LASERGENE software from DNASTAR Inc. The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs. The scale beneath the tree measures the distance between sequences. Units indicate the number of substitution events. The above sequences were obtained from EMBL database having the following accession numbers: BSV, Banana streak virus (AJ002234); CSSV, Cacao swollen shoot virus (L14546); CoYMYV, Cassava yellow mottle virus (X52934); DaBV, *Dioscorea alata* bacilliform virus (X94576); PhilI (X57924) and ScBV, Sugarcane bacilliform virus (M89922)

Deteksi virus juga menggunakan latex test dan ELISA. Virus yang didapat dari inokulasi yang dilakukan di pembibitan dengan umur TN1 7 (tanaman rentan) hari dan index dengan ELISA 3-4 minggu setelah inokulasi. Partikel latex di sensitized (film yang dibuat peka cahaya) dengan imunoglobulin (IgG) parsial murni 1:150 pengenceran RTBV dan 1: 120 pengenceran RTSV. Konsentrasi untuk

coating IgG 1µg/ml untuk RTBV dan 1,5µg/ml untuk RTSV. IgG-alkaline phosphate conjugate diencerkan 1/2000 untuk RTBV dan 1/1000 untuk RTSV. Reaksi ini dilakukan pada 450 nm dengan MicroElisa Minireader MR 590 (Dynatech Laboratories, Virginia). Absorbansi lebih dari dua kali rata-rata empat sample kontrol sehat dikatakan positif (Tiongco *et al.*, 1993).

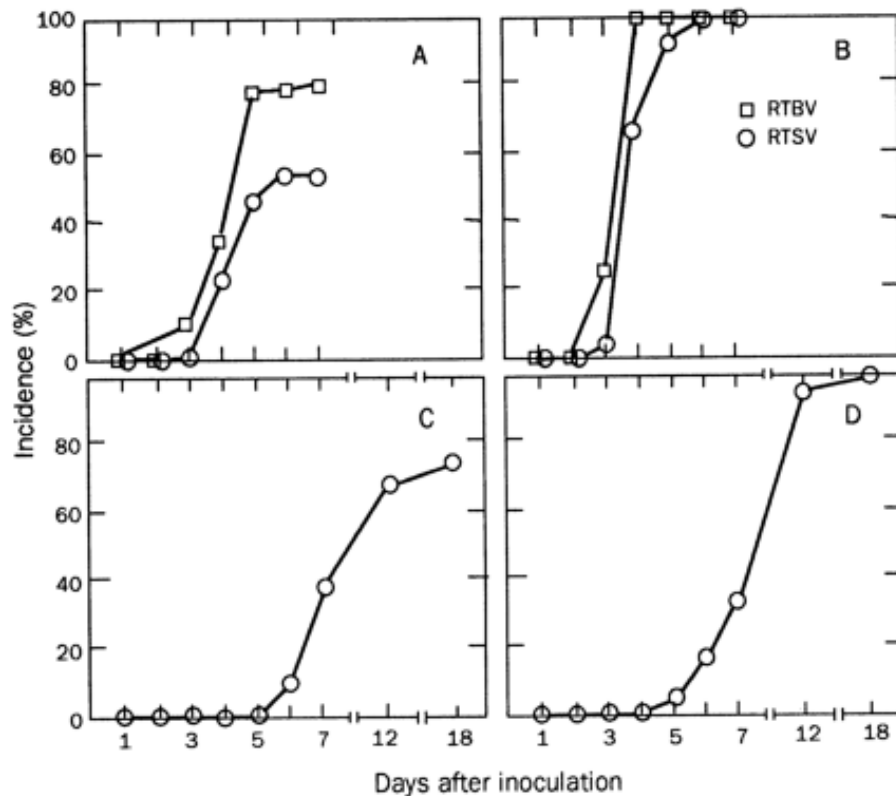


Fig. 1. Incidence of rice tungro bacilliform virus (RTBV) and rice tungro spherical virus (RTSV) as detected by enzyme-linked immunosorbent assay at different times after inoculating 21-day-old Taichung Native 1 plants 24 hr after inoculation feeding by (A) one leafhopper and (B) five leafhoppers that fed on plants infected with both RTBV and RTSV, or by (C) one leafhopper and (D) five leafhoppers that fed on plants infected with RTSV alone.

Persentase tanaman yang positif terhadap RTBV lebih tinggi dibanding RTSV. Insidensi penyakit yang diinokulasi dengan 5 wereng hijau memiliki persentase yang sama terhadap RTSV dan RTBV. Tanaman yang diinfeksi hanya dengan RTSV terlihat gejala positif pada hari ke empat dan ke lima. Penularan yang dilakukan oleh banyak vektor lebih cepat menunjukkan gejala (Tiongco *et al.*, 1993).

Perkembangan infeksi virus tungro dan infektifitas vektor setelah transplanting

diuji dengan berbagai kultivar TN1, IR22 (rentan), IR36, IR42 (moderat), IR54 dan IR58 (tahan) pada musim hujan (Agustus-Oktober). Benih tersebut ditanam pada plot 2x2 m dengan 4 ulangan untuk menentukan efek ketahanan vektor pada perkembangan infeksi virus. Pengamatan dimulai 30 hari setelah tanam, sample daun diambil pada setiap plot dan diuji dengan latex test. Pengamatan yang sama juga dilakukan pada musim kemarau (Januari-Maret) (Tiongco *et al.*, 1993).

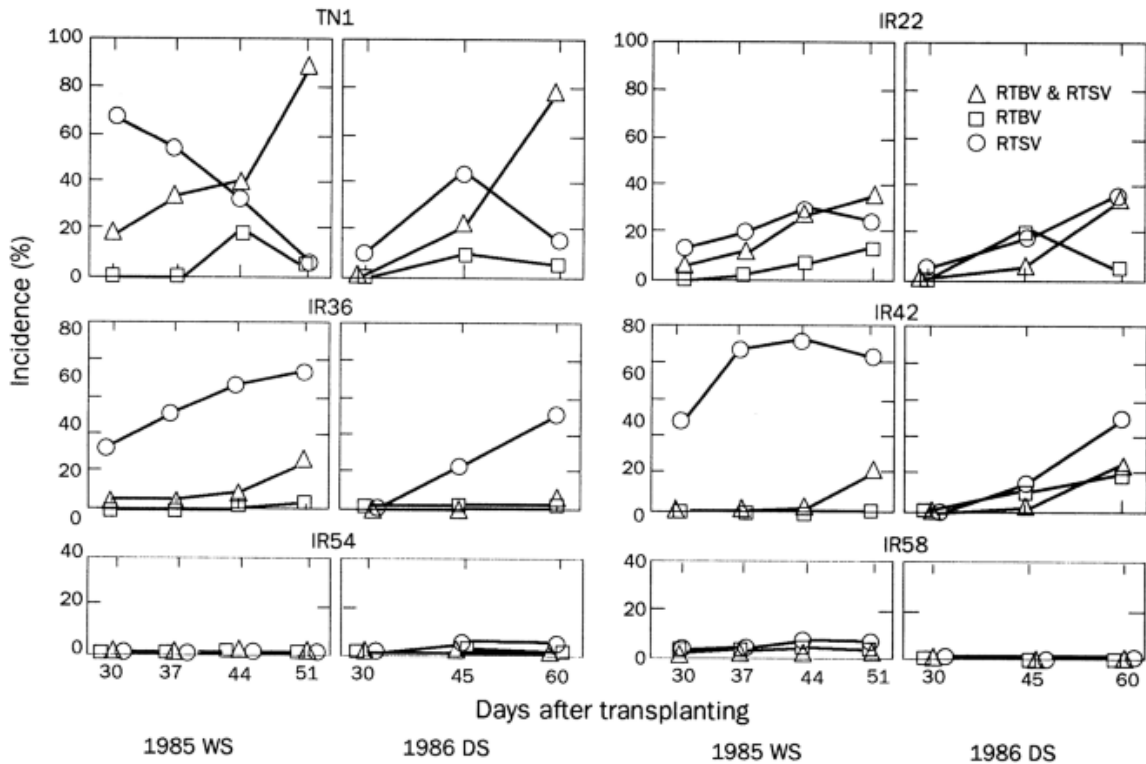


Fig. 4. Development of rice tungro bacilliform virus (RTBV) and rice tungro spherical virus (RTSV) infection in six rice cultivars during the 1985 wet season (WS) and 1986 dry season (DS) croppings, Laguna, Philippines. Rice cultivars Taichung Native 1 (TN1) and IR22 are susceptible, IR36 and IR42 are moderately resistant, and IR54 and IR58 are highly resistant to the leafhopper vector, *Nephotettix virescens*.

SIMPULAN

Perkembangan infeksi virus 30 hari setelah inokulasi lebih tinggi pada kultivar rentan dan infeksi rendah pada kultivar IR54 dan IR58. Perkembangan infeksi

RTSV musim kemarau pada kultivar rentan relatif menurun (Tiongco *et al.*, 1993).

DAFTAR PUSTAKA

- Azzam, O., M. Arboleda, K.M. Umadhay, J.B. Delos, F.S. Cruz, and A. Mackenzie. 2000. Genetic composition and complexity of virus populations at tungro-endemic and outbreak rice sites. *Arch. Virol.* 145: 2643-2657.
- Herzog, E., O. Guerra-Peraza and T. Hohn. 2000. The rice tungro bacilliform virus gene II product interacts with the coat protein domain of the viral gene III polyprotein. *Jornal of Virology* 74: 2073-2083.
- Hibino, H., M. Roechan and S. Sudarisman. 1978. Association of two types of virus particles with penyakit habang (tungro diseases) of rice in Indonesia. *Phytopathology* 68: 1412-1416.
- Hull, R. 1996. Molecular biology of rice tungro viruses. *Annual Review of Phytopathology* 34: 275-297.
- Jones, M. C., K. Gough, I. Dasgupta, B. I. Subba Rao, J. Cliffe, R. Qu, P. Shen, M. Kaniewska, M. Blakebrough, J. W. Davies, R. N.

- Beachy and R. Hull. 1991. Rice Tungro is Caused by an RNA and a DNA Virus. *Journal of General Virology* 72: 757-761.
- Nath, N., S. Mathur and I. Dasgupta. 2002. Molecular analysis of two complete rice tungro bacilliform virus genomic sequences from india. *Archives of Virology* 147: 1173-1187.
- Perin, Y and R. Hull. 1999. Original reverse transcription polymerase chain reaction method to obtain the full-length cDna of rice tungro spherical virus. *Journal of Virological Methods* 79: 161-168.
- Shen, P., M. Kaniewska, C. Smith and R.N. Beachy. 1993. Nucleotide sequence and genomic organization of rice tungro spherical virus. *Virology* 193: 621-630.
- Sumardiyono, Y.B., S. Hartono dan I. Suswanto. 2004. Interaksi RTV dengan Wereng Hijau dan daur Penyakit Tungro pada Padi. *Prosiding Seminar Nasional Status Program Penelitian Tungro Mendukung Keberlanjutan Produksi Padi Nasional*. Makassar, 7-8 September 2004.
- Thole, V. and R. Hull. 1996. Rice Tungro spherical virus: nucleotide squence of the 3' genomic half and studies on the 3' two small open reading frames. *Virus genes* 13: 239-246.
- Tiongco, E. R., R.C. Cabunagan, Z. M. Flores, H. Hibino., and H. Koganezawa. 1993. Serological monitoring of rice tungro diseases development in the field: It's implication in diseases management. *Plant Disease* 77: 877-882.
- Tiongco, E.R., R. C. Cabunagan, Z. M. Flores, H. Hibono and H. Koganezawa. 1993. Serological Monitoring of Rice Tungro Disease Development in the Field: Its Implication in Disease Management. *Plant Disease* 77: 877-882.
- Zhang, S., G. Lee, J. W. Davies, and R. Hull. 1997. Variation in coat protein genes among five geographically different isolates of rice tungro spherical virus. *Arch Virol* 142: 187-1879