



UNIVERSITAS
GADJAH MADA

METODE MULTIPLEX RT-PCR UNTUK DETEKSI SIMULTAN CRINIVIRUS DAN BEGOMOVIRUS PADA TANAMAN TOMAT

ESTI PRASETYA N, Dr. Ir. Sedyo Hartono, M.P; Dr. Ir. Sri Sulandari, S.U

Universitas Gadjah Mada, 2018 | Diunduh dari <http://etd.repository.ugm.ac.id/>

METODE MULTIPLEX RT-PCR UNTUK DETEKSI SIMULTAN *CRINIVIRUS* DAN *BEGOMOVIRUS* PADA TANAMAN TOMAT

ESTI PRASETYA NINGRUM

16/403803/PPN/04100

INTISARI

Akhir-akhir ini banyak terjadi gejala menguning pada tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum* Miller) dengan indikasi terancam infeksi campuran *Crinivirus* dan *Begomovirus*. Serangan kedua virus tersebut menginduksi gejala menguning pada daun dan menyebabkan buah menjadi kurang layak dipasarkan. Deteksi beberapa virus tanaman selama ini dilakukan secara terpisah. Salah satu metode deteksi cepat, akurat dan efisien beberapa virus tanaman secara simultan yaitu metode *multiplex* RT-PCR. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi virus-virus yang berasosiasi dengan penyakit kuning pada tanaman tomat dan serangga vektornya serta mengoptimasi metode *multiplex* RT-PCR untuk deteksi simultan *Crinivirus* dan *Begomovirus*. Metode yang digunakan adalah survei lapangan, ekstraksi RNA/DNA dari tanaman dan serangga dengan beberapa metode, kuantifikasi RNA/DNA, sintesis cDNA, single RT-PCR dan PCR, *multiplex* RT-PCR, visualisasi hasil amplifikasi RT-PCR dan PCR serta analisa sekuen DNA. Hasil pengamatan lapangan di daerah Kopeng dan Ketep (Jawa Tengah), Pakem (Yogyakarta), Bogor (Jawa Barat) dan Malang (Jawa Timur) ditemukan adanya variasi gejala klorosis menyerupai gejala infeksi campuran *Crinivirus* dan *Begomovirus* dengan kejadian penyakit di atas 50% dan ditemukan populasi kutu kebul di sekitar pertanaman tomat. Berdasarkan pengujian laboratorium, metode ekstraksi dsRNA sederhana menghasilkan RNA virus murni sedangkan metode SDT dan kit komersial menghasilkan RNA total. Konsentrasi RNA dengan metode dsRNA sederhana dan SDT lebih rendah dibandingkan kit komersial, namun kedua metode dapat digunakan dalam deteksi rutin untuk preparasi RNA karena lebih efisien dibandingkan kit komersial. Ekstraksi DNA tanaman menggunakan kit komersial menghasilkan DNA total dimana konsentrasi DNA tanaman yang diperoleh cukup tinggi dan memiliki kualitas sangat baik. Hasil *multiplex* RT-PCR menggunakan tiga pasang primer spesifik dengan suhu annealing 58 °C berhasil mengamplifikasi tiga virus secara simultan pada sampel tanaman dari Kopeng, Ketep dan Bogor. Hal ini menunjukkan bahwa tehnik *multiplex* RT-PCR sesuai untuk deteksi simultan TICV, ToCV dan *Begomovirus* pada tanaman tomat. Hasil sekuen DNA dari sampel tanaman diperoleh TICV dan ToCV untuk *Crinivirus* serta PepYLCIV dan ToLCNDV untuk *Begomovirus*. Hasil single RT-PCR maupun *multiplex* RT-PCR serangga *T. vaporariorum* menunjukkan pertanaman tomat di daerah Ketep dan Kopeng dapat terinfeksi oleh TICV dan/atau ToCV. Sedangkan untuk hasil single PCR maupun *multiplex* RT-PCR serangga *B. tabaci* menunjukkan pertanaman tomat di daerah Pakem dapat terinfeksi oleh *Begomovirus* dan/atau ToCV.

Kata Kunci : *Begomovirus*, *Crinivirus*, dsRNA, *multiplex* RT-PCR, SDT



RT-PCR MULTIPLEX METHOD FOR THE SIMULTANEOUS DETECTION OF CRINIVIRUS AND BEGOMOVIRUS ON TOMATO PLANTS

ESTI PRASETYA NINGRUM

16/403803/PPN/04100

ABSTRACT

Lately, there have been a lot of yellowing symptoms on tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Miller) with indications of being threatened by a mixed infection with Crinivirus and *Begomovirus*. The attacks of both viruses induce yellowing of the leaves and cause the fruit to be less marketable. Detection of several plant viruses has been carried out separately. One method of rapid, accurate and efficient detection of several simultaneous plant viruses is the *multiplex* RT-PCR method. This study aims to detect viruses associated with yellowing diseases in tomato and insect vector plants and optimize the *multiplex* RT-PCR method for simultaneous detection of Crinivirus and *Begomovirus*. The methods used were field survey, extraction of RNA / DNA from plants and insects with several methods, RNA / DNA quantification, cDNA synthesis, single RT-PCR and PCR, *multiplex* RT-PCR, visualization of RT-PCR and PCR amplification results and sequence analysis. DNA. Field observations in the areas of Kopeng and Ketep (Central Java), Pakem (Yogyakarta), Bogor (West Java) and Malang (East Java) found variations in symptoms of chlorosis resembling the symptoms of mixed infections with Crinivirus and *Begomovirus* with disease incidence above 50% and found whitefly populations around tomato plants. Based on laboratory testing, simple dsRNA extraction methods produce pure viral RNA while the SDT method and commercial kits produce total RNA. RNA concentrations with simple dsRNA methods and SDT are lower than commercial kits, but both methods can be used in routine detection for RNA preparation because it is more efficient than commercial kits. DNA extraction of plants using a commercial kit produces total DNA in which the DNA concentration of plants obtained is quite high and has very good quality. The results of *multiplex* RT-PCR using three pairs of specific primers with annealing temperature of 58 oC succeeded in amplifying three viruses simultaneously on plant samples from Kopeng, Ketep and Bogor. This shows that the *multiplex* RT-PCR technique is suitable for simultaneous detection of TICV, ToCV and *Begomovirus* in tomato plants. The DNA sequences from plant samples were obtained by TICV and ToCV for Crinivirus and PepYLCIV and ToLCNDV for *Begomovirus*. Single RT-PCR results and *T. vaporariorum* insect *multiplex* RT-PCR showed that tomato planting in Ketep and Kopeng areas could be infected by TICV and/or ToCV. Whereas for single PCR and *multiplex* RT-PCR results, *B. tabaci* showed that tomato planting in Pakem area could be infected by *Begomovirus* and/or ToCV.

Keywords: *Begomovirus*, *Crinivirus*, dsRNA, *multiplex* RT-PCR, SDT