

**ANALISIS RUNUTAN NUKLEOTIDA GEN PROTEIN SELUBUNG DUA STRAIN
PEANUT STRIPE VIRUS**

**NUCLEOTIDE SEQUENCE ANALYSIS OF COAT PROTEIN GENE FROM TWO
STRAINS OF PEANUT STRIPE VIRUS**

Hasriadi Mat Akin

Jurusan Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung

ABSTRACT

Nucleotide sequence analysis of coat protein gene from two biological strains of peanut stripe virus (PStV), severe blotch (PStV-Isb) and stripe (PStV-Is), has been done to study molecular variation of these strains. Comparison of predicted amino acid sequence of PStV coat protein with other members of bean common mosaic virus (BCMV) subgroup was also carried out to study the taxonomic relationship between PStV and BCMV subgroup. The CP gene from these strains contained 861 nucleotides (nts) and encoded 287 amino acids. There were seven nucleotides of the CP gene and one nucleotide of N1b cistron that were different between PStV-Is and PStV-Isb. However, only one nucleotide at position 9309 of the CP gene caused differential amino acid residue at position 49 of the coat protein, methionine (M) for PStV-Isb and isoleucine (I) for PStV-Is. Comparison of the amino acid sequences revealed a sequence similarity of 89,9-90,9% of PStV and other BCMV subgroup. These results provide evidence that PStV and other BCMV subgroup are in the same virus with different strain.

Key words : peanut stripe virus, coat protein gene, nucleotide sequence

INTISARI

Analisis runutan nukleotida dan asam amino gen protein selubung PStV dari dua strain *peanut stripe virus* (PStV) yang menunjukkan gejala *stripe* (PStV-Is) dan *severe blotch* (PStV-Isb) telah dilakukan untuk mengetahui perbedaan kedua strain PStV tersebut pada tingkat molekuler. Analisis kesamaan runutan asam amino protein selubung PStV juga dilakukan untuk mengetahui hubungan taksonomi antara PStV dan subkelompok *bean common mosaic virus* (BCMV). Gen CP dari kedua strain PStV tersebut mempunyai runutan nukleotida 861 nukleotida (nt) yang menyandi 287 asam amino. Terdapat tujuh nukleotida dari gen CP dan satu nukleotida pada sistron N1b yang berbeda antara PStV-Is dan PStV-Isb. Analisis runutan nukleotida dan asam amino menunjukkan hanya satu mutasi pada posisi 9309 dari genom RNA-PStV yang menyebabkan terjadinya perbedaan asam amino pada selubung protein kedua strain PStV. Asam amino yang berbeda terdapat pada posisi ke-49 yaitu isoleusin (I) untuk PStV-Is dan metionin (M) untuk PStV-Isb. Analisis kesamaan runutan asam amino CP antara PStV-Is dan PStV-Isb dengan beberapa spesies virus dalam subkelompok BCMV menunjukkan persentase kesamaan antara 89,9-90,9%. Kesamaan runutan asam amino tersebut menunjukkan bahwa PStV merupakan anggota dari subkelompok BCMV.

Kata kunci: *peanut stripe virus*, gen protein selubung, runutan nukleotida

PENGANTAR

Peanut stripe virus (PStV) adalah salah satu spesies dari genus *Potyvirus*, dan famili *Potyviridae* (Francki *et al.*, 1991).

Genom PStV berukuran 10059 nt tidak termasuk ekor poliadenilat (poli-A). Pada genom RNA PStV terdapat protein (VPg) yang terikat secara kovalen pada ujung bagian 5' dan poli-A bagian ujung 3'

(Gunashinghe *et al.*, 1994; Shaw *et al.*, 1990). Genom RNA tersebut terdiri atas satu kerangka baca (*open reading frame*) yang meliputi 95% total RNA. Kodon awal terletak 134–136 dan kodon stop 9768–9770 nukleotida dari ujung bagian 5' RNA (Gunashinghe *et al.*, 1994).

Di Indonesia PStV paling dominan pada kacang tanah dibandingkan dengan virus-virus yang lain. PStV diketahui terdapat hampir di seluruh pertanaman kacang tanah dan merupakan salah satu penyebab rendahnya daya hasil kacang tanah (Saleh *et al.*, 1989). Salah satu faktor penyebab PStV menjadi endemik di lokasi-lokasi budidaya kacang tanah di Indonesia adalah kemampuan virus ini untuk menular melalui benih (*seedborne*). Penelitian Akin & Sudarsono (1997) menunjukkan bahwa terdapat enam strain PStV yang menginfeksi kacang tanah yang diisolasi dari berbagai daerah di Indonesia. Strain-strain PStV tersebut dibedakan berdasarkan karakter gejala infeksi pada kacang tanah, yaitu: *blotch*, *blotch-stripe*, *chlorotic ring-mottle*, *mild mottle*, *severe blotch*, dan *stripe*.

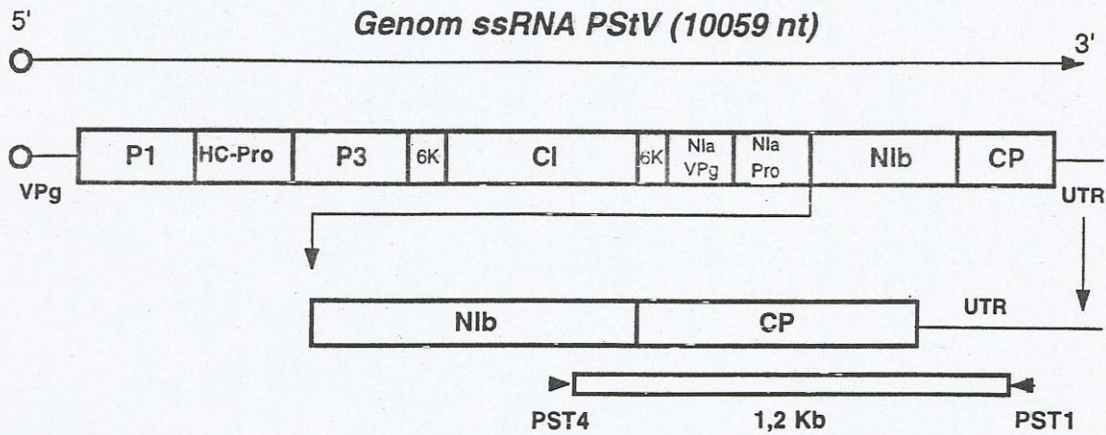
Penggolongan potyvirus sampai saat ini masih sulit dilakukan dengan baik karena besarnya variasi antar anggota kelompok (Ward & Shukla, 1990). Shukla & Ward (1988) menggunakan runutan asam amino CP untuk mengetahui hubungan kekerabatan anggota *potyvirus*. Hasil kajian tersebut menunjukkan bahwa spesies yang berbeda mempunyai kesamaan runutan asam amino CP berkisar antara 38–71%; sedangkan untuk strain dalam satu subkelompok berkisar antara 90–99%.

Analisis runutan nukleotida gen protein selubung protein PStV ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan antara strain PStV-Is yang menunjukkan gejala *Stripe* dan strain PStV-Isb yang menunjukkan gejala *Severe Blotch* pada taraf molekuler dan hubungan taksonomi PStV-Is dan PStV-Isb dengan subkelompok BCMV.

BAHAN DAN METODE

Karakter strain PStV. Strain PStV yang digunakan dalam penelitian ini adalah strain PStV yang menunjukkan gejala *stripe* (PStV-Is) dan *severe blotch* (PStV-Isb) dan telah dikarakterisasi oleh Akin & Sudarsono (1997). Kedua strain tersebut diisolasi dari Bogor (PStV-Is) dan Palangkaraya (PStV-Isb). Strain PStV-Is menimbulkan gejala berupa garis-garis kuning klorosis sepanjang tulang daun kacang tanah; sedangkan PStV-Isb menimbulkan gejala infeksi belang (*blotch*) berupa bercak berwarna hijau tua dan diikuti dengan malformasi bentuk daun pada daun kacang tanah kultivar Landak.

Amplifikasi dan perunutan nukleotida gen CP. Untuk mengetahui runutan nukleotida gen yang mengkodekan protein selubung PStV, pertama-tama dilakukan amplifikasi dengan teknik RT-PCR menggunakan primer nukleotida PST1 dan PST4 (Tabel 1). DNA hasil amplifikasi RT-PCR tersebut diklon pada plasmid vektor pGEM-T *easy* (Promega). Plasmid rekombinan selanjutnya digunakan untuk perunutan (*sequencing*) nukleotida gen CP-PStV.



Gambar 1. Hasil amplifikasi RT-PCR cDNA 1,2 Kb dari genom RNA PStV dengan primer PST1 dan PST4.

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk peruntukan nukleotida cDNA dari 3' genom RNA-PStV

Primer	Runutan nukleotida	Posisi hibridisasi
PST1	5'GCATGCCCTCGCCATTGCAA3'	10.003-9984
PST4	5'TACATAGCAGAATCAGCACT3'	8810-8829
PST5	5-'GCCTTTCAGTATTCTCGCTG-3'	9740-9721
PST7	5'-CAATTGACATCTGTTTCATC-3'	9326-9308
PST8	5'-CTTCGTCAAATCATGCACC-3'	9461-9479
PST10	5'-AATGAATGATGAACAGATGTC-3'	9301-9321

Tabel 2. Beberapa virus yang digunakan untuk analisis hubungan taksonomi antara PStV dan subkelompok BCMV

Subkelompok BCMV	Strain	Gen CP (nt)	Asam amino CP	No. Gene Bank	Pustaka
<i>Peanut stripe virus</i>	PStV-Is	861	287	-	Penelitian ini
<i>Peanut stripe virus</i>	PStV-Isb	861	287	-	Penelitian ini
<i>Bean common mosaic virus</i>	BCMV-NL4	861	287	L217660	-
<i>Blackeye cowpea mosaic virus</i>	BICMV	861	287	S66253	-
<i>Azuki bean mosaic virus</i>	AzMV	861	285	U60100	Coelmer <i>et al.</i> , 1996
<i>Dendrobium mosaic virus</i>	DMV	861	285	U23564	Hu, 1995

Perunutan nukleotida gen CP dilakukan mengikuti prosedur *Big Dye Terminator Kit* (Perkin Elmer). Primer T7 dan SP6 dan empat primer internal (PST5, PST7, PST7, PST8) digunakan untuk mengetahui total runutan nukleotida kedua utas gen CP (Tabel 1). Runutan nukleotida dibaca menggunakan alat ABI PRISM Model 377 Version 3.0. Konsensus runutan nukleotida untuk masing-masing strain ditentukan berdasarkan runutan nukleotida dari dua klon dan apabila terdapat perbedaan nukleotida dari kedua klon tersebut maka klon ketiga digunakan untuk menentukan nukleotida pada posisi tersebut.

Analisis runutan nukleotida gen CP. Analisis runutan nukleotida gen CP dilakukan menggunakan program *Sequencher Version 3.0*. Runutan asam amino CP-PStV diprediksi berdasarkan konsensus runutan nukleotida gen CP dilakukan dengan program *ANGIS (Australian National Genomic Information Service)*. Multi pasangan runutan nukleotida gen CP dan asam amino CP dianalisis dengan program *CLUSTAL W* (Thomson *et al.*, 1994).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsensus runutan nukleotida gen CP dari kedua strain PStV-Isb dan PStV-Is terdiri atas 861 nt. Gen CP tersebut mempunyai satu kerangka baca (*open reading frame*) tanpa kodon awal dan diakhiri dengan kodon stop pada bagian yang memisahkan gen CP dengan 3'UTR (Gambar 2). Terdapat tujuh nukleotida pada gen CP dan satu nukleotida pada sistron Nib yang berbeda antara PStV-Is dan PStV-Isb (Tabel 3).

Prediksi runutan asam amino protein selubung dari gen CP kedua strain PStV menghasilkan 287 asam amino (Gambar 3). Terdapat situs pemotongan protease (Q/S: glutamin/serin) yang memisahkan runutan asam amino CP dengan protein Nib, dan terdapat valin (V) pada posisi -4 dari situs pemotongan protease (Q/S) yang merupakan situs pengenalan pada proses pemotongan poliprotein hasil translasi genom potyvirus. Runutan asam amino CP PStV mempunyai motif DAG (asam aspartat-alanin-glisin) sebagai situs pengenalan dalam proses transmisi dengan vektor aphid (Gambar 3).

Analisis runutan nukleotida dan asam amino menunjukkan bahwa hanya satu mutasi pada posisi 9309 dari genom RNA-PStV yang menyebabkan terjadinya perbedaan satu asam amino pada selubung protein kedua strain PStV. Asam amino yang berbeda terdapat pada posisi ke-49 yaitu isoleusin (I) untuk PStV-Is dan metionin (M) untuk PStV-Isb. Mutasi titik yang lain terjadi pada basa ketiga dari kodon *Wobble* yang tidak menimbulkan perbedaan asam amino yang ditranslasi (Gambar 3).

Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan bahwa tipe gejala dan kisaran tanaman dikendalikan oleh faktor genetika virus. Strain-strain virus yang menunjukkan gejala penyakit yang berbeda biasanya disebabkan oleh satu atau beberapa mutasi titik (*point mutation*) pada genom virus (Gibbs *et al.* 1997). Broglio (1995) melaporkan mutasi titik pada salah satu gen (gen VI) CaMV (*cauliflower mosaic virus*) dapat mengubah gejala, menghilangkan atau mengurangi kemampuan CaMV dalam menginfeksi beberapa tanaman inang.

8810	UACAUAGCAGAAUCAGCACUAAAAACACUUUACACCAACA	PStV-Is
	A	PStV-Isb
8850	AAAGAACAAAAUUGAAGAGUUGGCAAAGTAUUUUAGCUGU	PStV-Is
		PStV-Isb
8890	GCUUGAUUUUGACUUAUGAAGUUGGGUGUGGAGAAUCUGUG	PStV-Is
		PStV-Isb
9030	CAUUUGCAGUCAGGAAGCAGCACAACACAACCACCAGUUG	PStV-Is
	CP →	PStV-Isb
9070	UGGAUGCUGGCGUGGAUACUGCCAAGGACAACAAAGAAAA	PStV-Is
	U	PStV-Isb
9110	GAGCAACAAAGGAAAAGGUCCUGAAAGCGGUGAAGGGUCA	PStV-Is
		PStV-Isb
9150	GGUAAUAAUAGUCGUGGAACAGAGAAUCAAUCAAUAGAG	PStV-Is
	G	PStV-Isb
9190	ACAAGGAUGUGAAUGCUGGUUCAAAGGAAAGAUUGUCC	PStV-Is
	C	PStV-Isb
9230	UCGGCUUCAGAAGAUCAAAAGAGAAUGAAUUUGCCAAUG	PStV-Is
		PStV-Isb
9270	GUGAAAGGAAAGUGAUCUUGAAUUUAGAUCAUCUUUJAG	PStV-Is
	U G	PStV-Isb
9310	AUUACAAGCCAGAGCAAACUGAUCUUUUAACACAAGAGC	PStV-Is
		PStV-Isb
9350	AACAAGAUGCAGUUUGAAAUGUGGUACAAUGCUGUAAAAG	PStV-Is
		PStV-Isb
9390	GGCGAGUAUGAAUAGAUGAUAAACAGAUUCAAUUGUGA	PStV-Is
		PStV-Isb
9430	UGAAUGGCUUUAUGGUGUGGUGUAUUGACAAUGGCACUUC	PStV-Is
		PStV-Isb
9470	ACCGGAUGUAAAUGGAACAUGGGUGAUGAUGGAUGGACAU	PStV-Is
		PStV-Isb
9510	GAGCAAGUGGAUUAUCCUCUCAAACCAUGGUUGAGAAUG	PStV-Is
		PStV-Isb
9550	CAAAACCUACACUUCGUCAAAUCAUGCACCAUUUCUCAGA	PStV-Is
		PStV-Isb
9590	UGCAGCUGAAGCAUACAUUGAGAUGAGAAAUCUGAGCGA	PStV-Is
		PStV-Isb
9630	CCAUACAUGCCUAGGUUUGGAUUGCUCGGAAUUUGAGGG	PStV-Is
	U	PStV-Isb
9670	AUAAAAUCUAGCUCGCUACGCUUUCGACUUCUAUGAAGU	PStV-Is
		PStV-Isb
9710	AACUCCAAGACAUCAUUGUGCAAGGGAAGCAGUAGCA	PStV-Is
		PStV-Isb
9750	CAGAUGAAGGCAGCAGCCUCAGCAAUGUUAACAGCAAGU	PStV-Is
		PStV-Isb
9790	UGUUUGGACUUGAUGGGAAUGUGGCAACAACCAGCGAGAA	PStV-Is
		PStV-Isb
9830	UACUGAAAGGCACACUGCAAGGGACGUUAAUCAAAACAUG	PStV-Is
		PStV-Isb
9870	CACACACUUCUUGGCAUGGGUUCGCCGACAGUA	PStV-Is
	U	PStV-Isb

Gambar 2. Runutan nukleotida gen CP dari kedua strain PStV-Is dan PStV-Isb. Untuk PStV-Isb hanya nukleotida yang berbeda yang dituliskan.

PStV-Is YTNKRTKIEELAKYLAVLDFDYEVGCGESVHL
 PStV-Isb _____Nlb
 PStV-Is QSGSSTTQPPVVDAGVDTAKDKKEKSNKGGK
 PStV-Isb _____CP
 PStV-Is GPESGEGSGNNSRGTENQSIIRDKDVNAG
 PStV-Isb _____M
 PStV-Is SKGKIVPRLQKITKRMNLPVKGKIVITNL
 PStV-Isb _____
 PStV-Is DHLLDYKPEQTDLFNTRATKMQFEMWYNA
 PStV-Isb _____
 PStV-Is VKGEYEIDDEQMSIVMNGFMVWCIDNGTS
 PStV-Isb _____
 PStV-Is PDVNGTWMMMDGDEQVEYPLKPMVENAK
 PStV-Isb _____
 PStV-Is PTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNSERPYPMP
 PStV-Isb _____
 PStV-Is RYGLLRNLRDKNLARYAFDFYEVTSKTS
 PStV-Isb _____
 PStV-Is RAREAVAQMKAALSNVNSKLFGLDGNV
 PStV-Isb _____
 PStV-Is ATTSENERHTARDVNQNMHTLLGMGSPQ
 PStV-Isb _____

Gambar 3. Runutan asam amino CP dari strain PStV-Is dan PStV-Isb. Untuk PStV-Isb hanya asam amino yang berbeda yang dituliskan.

(VHLQS): Konsensus runutan asam amino untuk pemotongan protease (Q/S)

Tabel 3. Perbedaan nukleotida pada gen CP pada kedua strain PStV yang menimbulkan gejala berbeda pada kacang tanah terinfeksi

Strain PStV	Posisi terjadinya perbedaan nukleotida strain PStV							
	8829	9098	9185	9206	9281	9309	9657	9884
PStV-Is	C	C	A	U	A	A	C	C
PStV-Isb	A	U	G	C	U	G	U	U

Catatan: Posisi nukleotida dihitung berdasarkan genom RNA PStV (Gunashinghe *et al.*, 1994)

Tabel 4. Persentase kesamaan runutan nukleotida dan asam amino antara PStV dan beberapa spesies dari subkelompok BCMV

	BCMV-NL4	BICMV	AzMV	DMV
PStV-Is nt	88,9	87,1	88,7	87,9
aa	90,2	89,9	90,6	89,9
PStV-Isb nt	89,0	87,2	88,9	88,1
aa	90,6	90,2	90,9	90,5

Sebaliknya mutasi titik juga dapat mematahkan ketahanan tanaman inang (Kavanagh *et al.* 1992). Derrick *et al.* (1997) melaporkan delapan asam amino pada protein 126 dan 183 kDa mempengaruhi fenotipe gejala infeksi dua strain TMV. Penelitian Weiland & Edward (1996) menunjukkan substitusi satu nukleotida pada gen α dari *barley stripe virus* strain CV42 (BSV-CV42) mengubah strain patogen menjadi nirpatogen.

Analisis runutan nukleotida protein selubung PSTv dan virus yang termasuk ke dalam subkelompok BCMV dilakukan untuk mengetahui hubungan taksonomi antara PSTv dengan subkelompok BCMV. Hasil analisis runutan asam amino menunjukkan bahwa terdapat kisaran kesamaannya antara 89,9-90,9% (Tabel 4). Menurut Shukla & Ward (1988) virus-virus dalam satu subkelompok mempunyai persentase kesamaan runutan asam amino 90-99%. Hasil analisis ini membuktikan bahwa PSTv-Is dan PSTv-Isb merupakan anggota dari subkelompok BCMV.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada Proyek URGE (*University Research for Graduate Education*) dan ACIAR (*Australian Centre for International Agricultural Research*) atas dukungan dana untuk melakukan penelitian. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Dr. Ir. Sudarsono, M.Sc. dan Prof. Dr. Edi Guhardja atas segala bantuannya selama melakukan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

Akin, H.M. & Sudarsono. 1997. Characterization of Peanut Stripe Virus

(PSTv) Isolated from Various Provinces in Indonesia. *Indon. J. Trop. Agric.* 8: 13-20.
Broglia, E.P. 1995. Mutation Analysis of Cauliflower Mosaic Virus Gene VI: Changes in Host Range, Symptoms, and Discovery of Transactivation-positive, Noninfectious Mutans. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 755-760.

Collmer, C.W., M.F. Marston, S.M. Albert, S. Bajai, H.A. Maville, S.E. Ruuska, E.J. Vesely & M.M. Kyle. 1996. The Nucleotide Sequence of the Coat Protein Gene and 3' Untranslated Region of Azuki Bean Mosaic Potyvirus, a Member of the Bean Common Mosaic Virus Subgroup. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9 (8): 758-761.

Derrick, P.M., S.A. Carter & R.S. Nelson. 1997. Mutation of the Tobacco Mosaic Tobamovirus 126- and 183-kDa Protein: Effects on Phloem-Dependent Virus Accumulation and Synthesis of Viral Proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10 (5): 589-596.

Francki, R.I.B., C.M. Fauquet, D.L. Knudson & F. Brown. 1991. Classification and Nomenclature of Viruses. *Arch. Virol.* 2: 351-156.

Gibbs, M.J., J. Armstrong, G.F. Weiller & A.D. Gibbs. 1997. Virus Evolution, A Window on Future. In Tepfer and E. Balazs (Eds.) *Virus-resistant Transgenic Plants: Potential Ecological Impact*. Springer. Paris.

Gunashinghe, U.B., S. Flasiniski, R.S. Nelson & B.G. Cassidy. 1994. Nucleotide Sequence and Genome Organization of Peanut Stripe Potyvirus. *J. Gen. Virol.* 75: 2519-2526.

Hu, J.S. 1995. Purification, Host Range, Serology, and Partial Sequencing of Dendrobium Mosaic Potyvirus, A New Member of the Bean Common Mosaic Virus Subgroup. *Phytopathology* 85 (5): 542-546.

Kanavagh, T., M. Goulden, S. Santa Cruz, Chapme, I. Barker & D. Baucombe. 1992. Molecular Analysis of a Resistance-Breaking Strain of Potato Virus X. *Virology* 189: 609-617.

- Saleh, N., K.J. Middleton, Y. Baliadi, N. Horn & D.V.R. Reddy. 1989. Research on *Peanut Stripe Virus* in Indonesia, p. 9–10. In ICRISAT. *Summary Proceeding of the second Coordinators Meeting on Peanut Stripe Virus*. 1–4 Agustus 1989. India.
- Shaw, J.G., A.G. Hunt, T.P. Pirone & R.E. Rhoads. 1990. Organization and Expression of Potyvirus Genes. In Pirone, T.P. and J.G. Shaw (eds.). *Viral genes and Plant Pathogenesis*. Springer-Verlag, New York. 215 p.
- Shukla, D.D. & C.W. Ward. 1988. Amino Acid Sequence Homology of Coat Proteins as A Basis for Identification and Classification of the Potyvirus Group. *J. gen. Virol.* 69: 2703–2710.
- Thomson, J.D., D.G. Higgins & T.J. Gibson. 1994. Clustal W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nuc. Acid Res.* 22: 4673–4680.
- Ward, C.W. & D.D. Shukla. 1990. Taxonomy of Potyvirus: Current Problems and Some Solutions. *Intervirology* 32: 269–296.
- Weiland, J.J. & M.C. Edwards. 1996. A Single Nucleotide Substitution in α Gene Confers Oat Pathogenicity to Barley Stripe Mosaic Virus Strain ND18. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9 (1): 62–67.