

Penggunaan Pelacak DNA untuk Deteksi *Papaya ringspot virus* dengan Metode Hibridisasi Asam Nukleat

Use of DNA Probe for Detection of *Papaya ringspot virus* Using Nucleic Acid Hybridization Method

Irsan Nuhantoro, Kikin Hamzah Mutaqin, Sri Hendrastuti Hidayat*
Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

ABSTRAK

Penyakit bercak bercincin yang disebabkan oleh *Papaya ringspot virus* (PRSV) merupakan salah satu penyakit yang paling merusak pada tanaman pepaya. Penyakit ini dilaporkan pertama kali di Indonesia pada tahun 2012 di Nangroe Aceh Darussalam, kemudian menyebar dengan cepat ke daerah pertanaman pepaya di Sumatera, Jawa, dan Bali. Selain menggunakan metode serologi atau *polymerase chain reaction* (PCR), pengembangan metode deteksi PRSV diperlukan untuk memfasilitasi upaya pencegahan penyebaran PRSV. Tujuan penelitian ini ialah mengonstruksi pelacak DNA untuk pengembangan metode deteksi berdasarkan metode hibridisasi asam nukleat. Karakterisasi molekul isolat PRSV dari Boyolali (Jawa Tengah), Medan (Sumatera Utara), Sleman (Yogyakarta) dan Tabanan (Bali) berdasarkan pada urutan gen *HCPPro* menunjukkan bahwa keempat isolat memiliki tingkat kekerabatan yang tinggi dengan tingkat homologi, yaitu 97.9–99.1%. Dua fragmen DNA spesifik gen *HCPPro* dipilih sebagai pelacak DNA dengan pelabelan menggunakan bahan DIG-dioxigenin. Teknik hibridisasi asam nukleat dilakukan menggunakan kondisi optimum, yaitu *stringency washes* dengan 1×SSC dan 0.1% SDS pada suhu 60 °C selama 15 menit. Infeksi PRSV berhasil dideteksi dari beberapa sampel lapangan. Pelacak DNA PRSV yang dikonstruksi dari daerah *HCPPro* memiliki kespesifikan tinggi dan kepekaan pada konsentrasi DNA yang rendah, yakni 0.062 µg µL⁻¹.

Kata kunci: DIG-dioxigenin, *HCPPro*, karakterisasi molekul, kloning DNA, *polymerase chain reaction*

ABSTRACT

Papaya ringspot caused by *Papaya ringspot virus* (PRSV) is one of the most destructive diseases of papaya. The disease had not been found in Indonesia, until disease outbreak in Nangroe Aceh Darussalam was reported in 2012. Since then, the disease spread rapidly in most papaya growing areas in Sumatera, Java and Bali. *Papaya ringspot virus* (PRSV) is generally detected using serological or polymerase chain reaction methods. Improvement in detection method is necessary to facilitate a more reliable tool for controlling the spread of PRSV. The aim of the research was to construct DNA probe for development of detection method based on nucleic acid hybridization. Molecular characterization based on *HCPPro* gene sequence indicated high homology (97.88 to 99.05%) among PRSV isolates from Boyolali (Central Java), Medan (North Sumatera), Sleman (Yogyakarta) and Tabanan (Bali). Two DNA clones of *HCPPro* gene were selected for probe construction and the probes were then labeled using PCR DIG-dioxigenin. Optimization of nucleic acid dot blot hybridization method to achieve strongest positive reaction was developed, i.e. using stringency washes at 1×SSC, 0.1% SDS, incubation at

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Jalan Kamper, Kampus Darmaga IPB, Bogor 16680.
Tel : 0251-8629364, Faks : 0251-8629362, Surel : srihendrastutihidayat@gmail.com.

60 °C for 15'. The DNA probe for PRSV has a high specificity and sensitivity; it could detect PRSV at the lowest concentration of nucleic acid (0.062 µg µL⁻¹).

Key words : DIG-dioxigenin, DNA cloning, *HCP*ro, molecular characterization, polymerase chain reaction.

PENDAHULUAN

Papaya ringspot virus (PRSV) merupakan patogen penting pada tanaman pepaya dan memiliki kemampuan menyebar sangat cepat sehingga dapat menimbulkan insidensi penyakit hingga 100% (Sharma dan Tripathi 2014). PRSV termasuk famili *Potyviridae*, dengan kutudaun sebagai vektor yang menularkan secara nonpersisten (Kalleshwaraswamy *et al.* 2009). Dilaporkan terdapat dua tipe PRSV, yaitu PRSV tipe P dan PRSV tipe W yang memiliki tingkat kemiripan tinggi berdasarkan ciri morfologi dan serologi, tetapi berbeda dalam kisaran inang (Yeh *et al.* 1984).

Hidayat *et al.* (2012) melaporkan infeksi PRSV pertama kali di Indonesia terjadi di Provinsi Nanggroe Aceh Darusalam; sejak saat itu PRSV menyebar ke seluruh Indonesia. Berdasarkan Permentan no. 51 tahun 2015 dinyatakan bahwa PRSV termasuk sebagai organisme pengganggu tanaman karantina (OPTK) kategori A2 dengan daerah sebar di Sumatera, Jawa, dan Bali (Kementan 2015). Pencegahan penyebaran lebih lanjut dari PRSV perlu dilakukan dengan pemeriksaan kesehatan bibit tanaman pepaya mengingat tingginya lalu lintas perdagangan komoditas pertanian beberapa tahun terakhir ini. Oleh karena itu, metode deteksi yang cepat, tepat, dan akurat dibutuhkan dalam tindakan pemeriksaan karantina terhadap organisme pengganggu tanaman (OPT) terbawa oleh komoditas terutama untuk menekan risiko masuknya OPT ke wilayah baru.

Teknik deteksi menggunakan pelacak nukleotida telah banyak digunakan untuk mendeteksi patogen tanaman dengan tingkat kepekaan, kespesifikan, kecepatan, kemudahan, dan biaya yang tidak terlalu mahal (Wong dan Smart 2012). Kompleksitas asam nukleat antara asam nukleat pelacak dan asam

nukleat genom virus merupakan prinsip dasar dari hibridisasi. Metode deteksi *nucleic acid dot-blot hybridization* memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai metode deteksi OPTK, khususnya PRSV. Pelacak DNA spesifik dapat dikonstruksi berdasarkan tingkat homologi genom. Salah satu gen yang memiliki kesamaan yang rendah di antara anggota *Potyvirus* ialah gen *HCpro* yang memiliki peranan penting dalam penularan *Potyvirus* secara mekanis dan melalui kutudaun. Gen *HCpro* memiliki tingkat variabilitas yang tinggi antarspesies pada famili *Potyviridae*, namun terdapat motif asam amino yang *conserved* (motif tersebut hampir ditemukan di semua anggota *Potyviridae*), yaitu Phe-Arg-Asn-Lys (FRNK) (Sahana *et al.* 2014). Selain menyebabkan kehilangan kemampuan ditularkan melalui vektor kutudaun, mutasi pada daerah FRNK pada isolat *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)-AG juga mengakibatkan tidak munculnya gejala yang tampak pada tanaman mentimun, melon, dan semangka (Jamous *et al.* 2011). Derajat kesamaan pada daerah FRNK tersebut dapat digunakan sebagai daerah target pelacak DNA. Keberadaan daerah FRNK pada gen *HCpro* PRSV penting karena dengan mendeteksi daerah tersebut dapat diperoleh informasi keberadaan infeksi PRSV sekaligus kemampuan penularan dan virulensinya.

Penelitian ini bertujuan mendapatkan klon DNA rekombinan gen *HCpro* PRSV yang akan digunakan sebagai pelacak DNA dalam metode deteksi *nucleic acid dot blot hybridization*.

BAHAN DAN METODE

Karakterisasi gen *HCpro*

Isolat PRSV dalam penelitian ini berasal dari tanaman pepaya yang diperoleh dari Tabanan (Bali), Boyolali (Jawa Tengah),

Medan (Sumatera Utara), dan Sleman (DI Yogyakarta). Isolasi RNA total menggunakan kit komersial (QIAGEN RNAsasy). Metode RT-PCR digunakan untuk mengamplifikasi fragmen DNA. Sintesis cDNA menggunakan RevertAid M-MuLV *reverse transcriptase* (Thermo). Amplifikasi gen *HCPPro* PRSV dilakukan menggunakan pasangan primer PRSV953-F 5'-GCGATGCTCATAAACATACCTGA-3' dan PRSV953-R 5'-TGTACACAGTAC TTCGGTGAGAAGTCGTA-3' (Tuo *et al.* 2014). Perunutan DNA dilakukan dengan mengirimkan DNA produk PCR ke FirstBASE Laboratories Malaysia. Penyuntingan sikuen DNA dilakukan menggunakan perangkat lunak Bioedit dan selanjutnya dianalisis dengan metode *basic local alignment search tool* (BLAST) pada perangkat lunak Geneious R10 versi 10.0.7. Penyejajaran sikuen DNA dan konstruksi pohon filogeni berturut-turut dilakukan dengan program MUSCLE dan metode Bayesian.

Pembuatan Pelacak DNA

Dua pasang primer spesifik gen *HCPPro*, yaitu pasangan primer PRSV-84F/ PRSV-185R dan PRSV-166F/ PRSV-305R dirancang untuk mengamplifikasi empat isolat PRSV (isolat Boyolali, Medan, Sleman dan Tabanan) (Tabel 1). DNA hasil amplifikasi dengan kedua pasang primer tersebut selanjutnya digunakan untuk kloning DNA menggunakan metode TA-cloning (Zhou dan Gomez-Sanchez 2000) dengan plasmid pTZ257R (Thermo scientific). Transformasi plasmid dilakukan dengan metode kimia (Thermo InstAclone kit). Konfirmasi klon DNA rekombinan dilakukan beberapa tahap, yaitu seleksi klon

DNA rekombinan dengan metode seleksi putih biru, PCR koloni dengan primer M13, isolasi plasmid dan amplifikasi DNA target dengan primer spesifik, dan perunutan DNA. Klon DNA rekombinan yang telah terkonfirmasi dipilih, selanjutnya plasmid dipurifikasi mengikuti metode Tolmasky *et al.* (2007) dengan modifikasi pada beberapa tahapan, yaitu pembiakan bakteri pada media LB cair pada suhu 37 °C selama 6–12 jam, pemanenan bakteri dengan sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, dan presipitasi plasmid dengan sentrifugasi pada kecepatan 12 000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya plasmid digunakan sebagai templat dalam pembuatan pelacak DNA.

Hibridisasi DNA

Sampel yang digunakan ialah isolat PRSV asal Boyolali, Medan, Sleman, dan Titigalar (Bali), dan isolat ZYMV. Masing-masing sampel uji disiapkan hingga diperoleh DNA hasil amplifikasi, selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat terhadap sampel DNA tersebut (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4}). Sampel positif dipilih dari sampel yang dapat diamplifikasi dengan primer MJ-1/MJ-2 dan PRSV953-F/PRSV953-R. Sampel negatif dipilih dari sampel yang dapat diamplifikasi dengan primer MJ-1/MJ-2, namun tidak dapat diamplifikasi dengan primer PRSV953-F/PRSV953-R. Sampel negatif lainnya yang digunakan ialah sampel ZYMV yang diamplifikasi pada daerah *HCPPro* dengan primer HCProF 5'-GTGATTTCGAGGTTAGAGACGA-3' dan HCProR 5'-CCAACCTCTGTAATG TTTCAT-3' (Huet *et al.* 1994).

Tabel 1 Primer spesifik yang digunakan untuk membuat pelacak DNA

Primer	Urutan Basa (5'–3')	Ukuran (pb)	Target Gen	Lokasi (nt)
P1:				
PRSV-84F	GGGAGTGGCCGACAATGTTA	102	<i>HCPPro</i>	2854–2955
PRSV-185R	GATCAACAAGGATTCGCGGC			
P2:				
PRSV-166F	GCCGCGAATCCTTGTGATC	140	<i>HCPPro</i>	2936–3075
PRSV-305R	CACTATCGAGCGGCTCTCTG			

Pelabelan pelacak DNA dilakukan menggunakan DIG-dioxigenin dengan metode PCR labeling (Roche). Membran nitroselulosa 0.2 μ M (bioBasic) digunakan sebagai medium immobilisasi DNA sampel. Membran direndam dengan larutan denaturasi (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl), selanjutnya dicuci dengan larutan penetral (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris pH 7.4), kemudian dicuci dengan $2\times$ SSC. Pre-hibridisasi dilakukan dengan menginkubasi membran dalam larutan *DIG Easy Hyb* (Roche) pada suhu 42 °C selama 30 menit. Hibridisasi dilakukan dengan menginkubasi membran dalam 50 μ L pelacak DNA yang dilarutkan dalam 3.5 mL *DIG Easy Hyb* (Roche) pada suhu 42 °C selama 14–18 jam. Membran dicuci dengan $5\times$ SSC, selanjutnya dicuci dua kali dengan larutan bufer hibridisasi ($1\times$ SSC dan 0.1% SDS) pada suhu 60 °C dengan digoyang pada kecepatan 100 rpm selama 15 menit. Visualisasi reaksi hibridisasi dilakukan dengan metode kolorimetri menggunakan larutan substrat warna (1 tablet NBT/BCIP dalam 10 mL ddH₂O).

HASIL

Sampel tanaman sakit dari Boyolali, Medan, Sleman, dan Tabanan menunjukkan gejala khas infeksi PRSV, seperti yang dilaporkan sebelumnya oleh Gonsalves *et al.* (2010), Sharma *et al.* (2014), dan Chakraborty *et al.* (2015). Gejala yang diamati meliputi

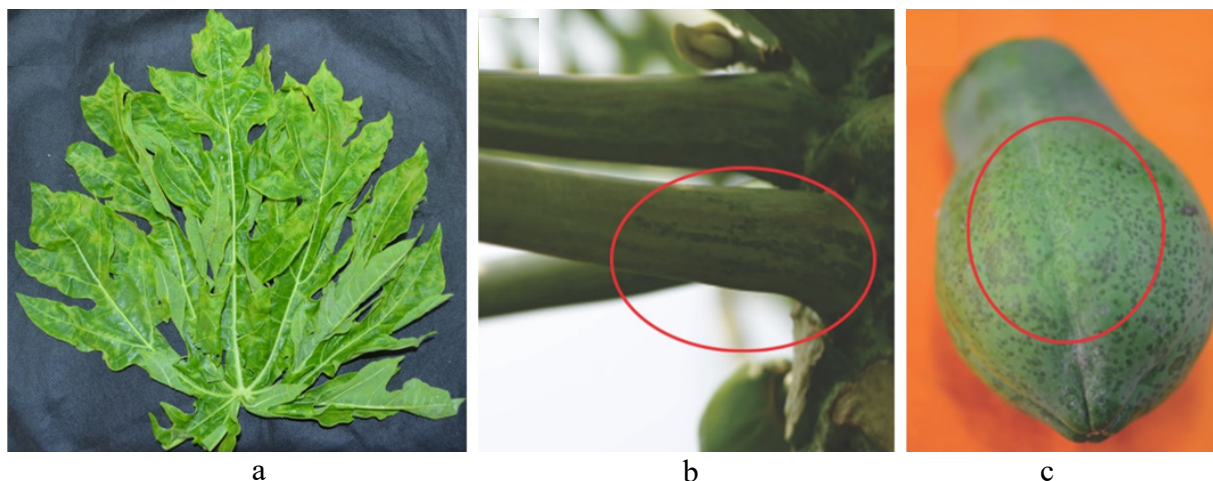
klorosis dan mosaik pada daun, bercak berminyak pada tangkai daun, dan bercak bercincin pada kulit buah (Gambar 1).

Karakterisasi Gen *HCpro*

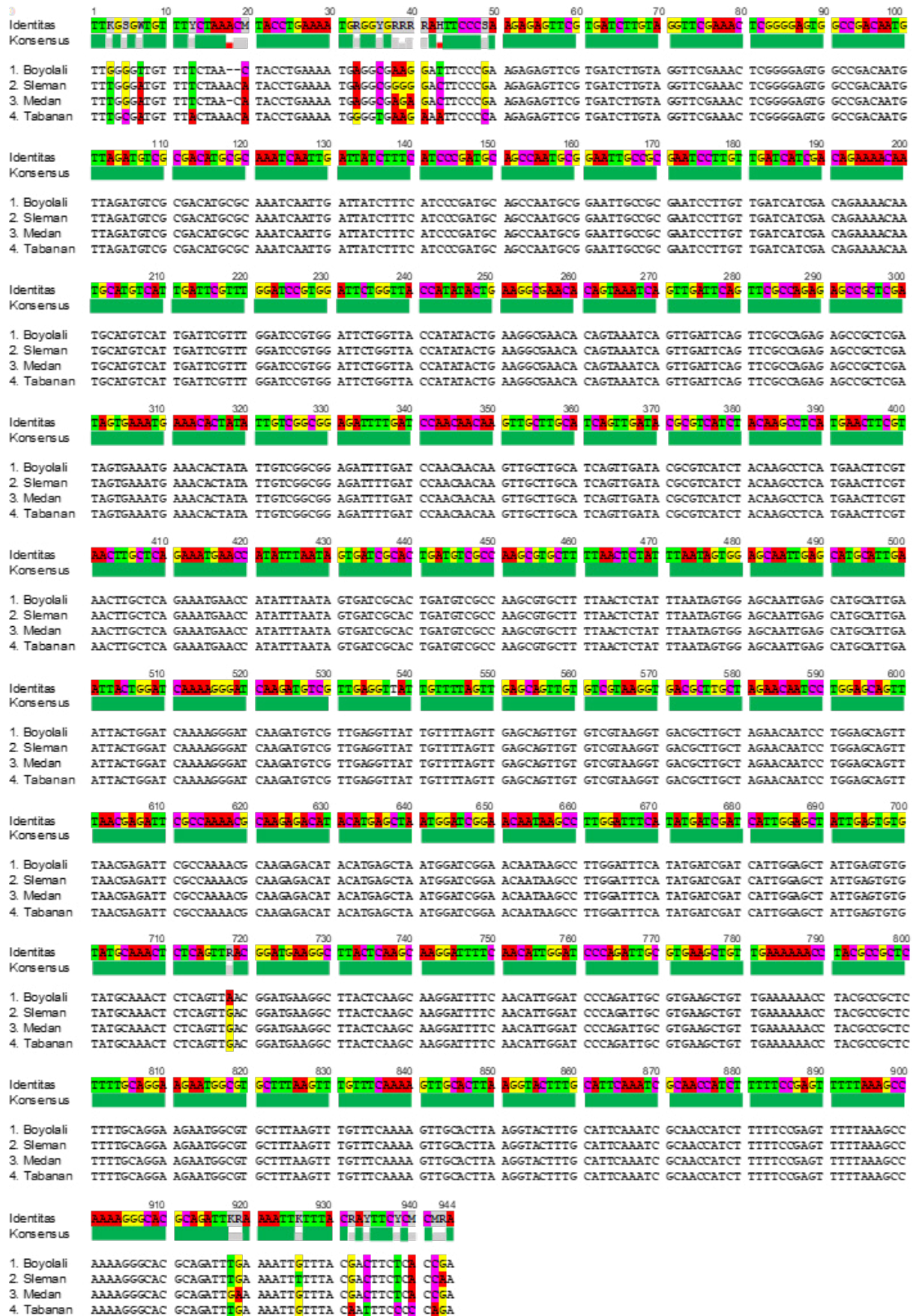
Teknik RT-PCR menggunakan primer spesifik PRSV953-F/PRSV953-R berhasil mengamplifikasi fragmen DNA \pm 953 pb untuk 4 sampel daun sakit. Analisis sikuen DNA hasil amplifikasi berhasil menyejajarkan nukleotida sebanyak 943 pb dengan jumlah basa yang identik sebanyak 919 basa atau 97.4% (Gambar 2). Tingkat homologi antara keempat isolat ialah 97.9–99.1% (Tabel 2), yang menunjukkan bahwa PRSV isolat Indonesia tersebut memiliki kekerabatan yang tinggi. Lebih lanjut, analisis sikuen DNA empat isolat PRSV menunjukkan tingkat *identity pairwise* sebesar 98.6%. Tingkat homologi yang tinggi antara empat isolat asal Indonesia menunjukkan bahwa isolat asal Indonesia (Boyolali, Medan, Sleman, dan Tabanan) memiliki kekerabatan yang tinggi. Homologi yang tinggi pada gen *HCPro* tersebut dapat digunakan untuk merancang pelacak DNA dengan memilih urutan nukleotida yang spesifik pada gen *HCPro*.

Pembuatan Pelacak DNA

Amplifikasi DNA PRSV dengan pasangan primer PRSV-84F/ PRSV-185R dan PRSV-166F/ PRSV-305R menghasilkan pita DNA berukuran berturut-turut 102 pb dan 140 pb.



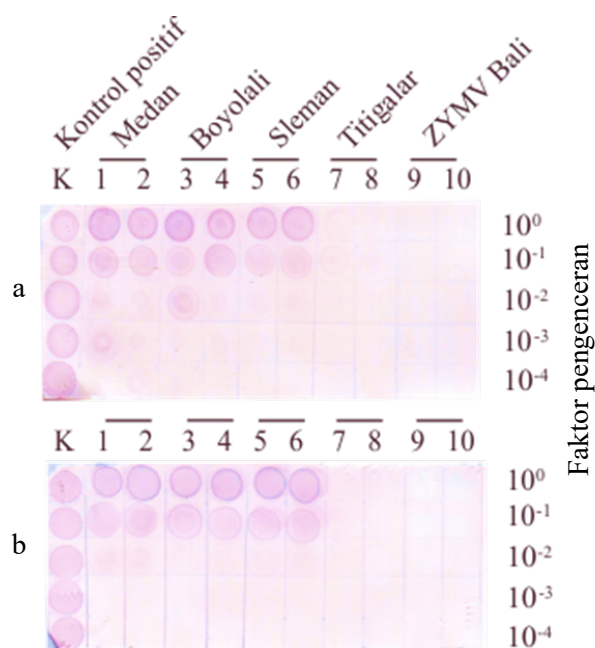
Gambar 1 Gejala infeksi PRSV pada tanaman pepaya. a, Mosaik pada daun; b, Bercak bergaris pada tangkai daun; dan c, Bercak bercincin pada buah.



Gambar 2 Hasil pensejajaran urutan DNA sebagian daerah gen *HCPPro / P3* isolat Boyolali, Medan, Sleman, dan Tabanan.

Tabel 2 Homologi sikuen nukleotida 4 isolat PRSV pada sebagian daerah gen *HCP* dan *P3*.

Isolat virus	No. aksesori GenBank	Homologi (%)			
		Sleman	Bali	Boyolali	Medan
Sleman	LC222656	100			
Tabanan	LC222653	99.1	100		
Boyolali	LC222654	98.6	98.9	100	
Medan	LC222655	97.9	97.9	98.3	100



Gambar 3 Hibridisasi asam nukleat dengan pelacak DNA yang dihasilkan dari amplifikasi. a, Pelacak DNA pP1PRSV1; dan b, Pelacak DNA pP2PRSV1.

Kloning dua DNA fragmen tersebut menghasilkan beberapa klon DNA rekombinan. Konfirmasi dengan PCR koloni telah dilakukan, selanjutnya dipilih masing-masing satu klon DNA rekombinan pP1PRSV1 dan pP2PRSV1 untuk digunakan sebagai pelacak DNA dalam metode deteksi hibridisasi.

Hibridisasi DNA

Hasil hibridisasi menggunakan dua pelacak DNA yang berbeda dengan dilabel DIG-dioxigenin berhasil mendeteksi keberadaan PRSV pada sampel positif, pada faktor pengenceran 10^{-1} dengan konsentrasi terendah sebesar $0.062 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ (Gambar 3). Sampel negatif, yaitu sampel isolat Titigalar (Bali) dan ZYMV menghasilkan reaksi negatif terhadap pelacak DNA yang digunakan.

PEMBAHASAN

Hibridisasi adalah proses saat pelacak DNA menempel dan berpasangan dengan DNA atau RNA target yang merupakan komplemennya. Kompleksifikasi antara pelacak DNA dan DNA atau RNA target akan terjadi jika pelacak DNA memiliki urutan basa yang saling komplemen serta suhu dan waktu hibridisasi yang optimum. Urutan basa yang spesifik akan meningkatkan kespesifikan dari pelacak DNA tersebut. Yamagishi *et al.* (2006) melaporkan pelacak DNA yang spesifik dapat digunakan untuk membedakan empat galur dari *Soybean dwarf virus* (SbDV). Kespesifikan dari pelacak DNA yang dikonstruksi dari gen *HCP* pada penelitian ini dirancang dari urutan basa nukleotida yang spesifik untuk mendeteksi keberadaan PRSV tipe P sekaligus mengetahui keberadaan gen *HCP* yang memiliki peran dalam penularan melalui vektor.

Metode *dot-blot hybridization* telah lama digunakan sejak pertama kali dikembangkan pada tahun 1983 (Leary *et al.* 1983) serta banyak digunakan karena memiliki tingkat kepekaan dan kespesifikan yang baik. Pada penelitian ini sampel positif terdeteksi positif pada konsentrasi $0.062 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. Sampel negatif, yaitu isolat Titigalar dan ZYMV menghasilkan hasil deteksi negatif terhadap pelacak DNA yang digunakan. Hasil ini menunjukkan bahwa dua pelacak DNA yang digunakan memiliki kespesifikan dan kepekaan yang baik. Kespesifikan dan kepekaan dari pelacak DNA juga tidak dipengaruhi oleh panjang basa yang digunakan untuk pelacak DNA. Hal ini telah dilaporkan Juan *et al.* (2007) sebelumnya bahwa deteksi ZYMV, *Water melon mosaic virus* (WMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), dan PRSV

tipe W yang dideteksi dengan pelacak DNA spesifik untuk masing-masing target dengan panjang basa yang berbeda menghasilkan tingkat kespesifikan dan kepekaan yang sama. Penggunaan pelacak DNA dengan urutan basa nukleotida yang lebih pendek akan menghemat penggunaan pelabel DIG-dioxigenin. Penggunaan pelacak DNA yang digunakan secara berulang akan menghemat biaya deteksi patogen tanaman. Pelacak DNA pada penelitian ini digunakan secara berulang sebanyak 4 kali dan hasil deteksi pada tingkat kespesifikan dan kepekaan yang sama. Telah dilaporkan sebelumnya oleh Nageswara-Rao *et al.* (2013) pelacak DNA dengan label DIG-dioxigenin dapat digunakan berulang sebanyak 12–15 kali tanpa kehilangan kespesifikan dan kepekaan.

Klon DNA yang mengandung sisipan gen *HCP* PRSV dapat digunakan sebagai pelacak DNA dalam metode *nucleic acid dot blot hybridization* untuk mendeteksi infeksi PRSV pada tanaman pepaya. Penggunaan pelacak DNA dalam metode deteksi dengan tingkat kespesifikan dan kepekaan yang tinggi akan memberikan hasil identifikasi yang akurat terutama untuk mencegah masuk atau menyebarnya OPTK.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Badan Karantina Pertanian yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Chakraborty P, Das S, Saha B, Sarkar P, Karmakar A, Saha A, Saha D, Saha A. 2015. Phylogeny and synonymous codon usage pattern of *Papaya ringspot virus* coat protein gene in the sub-Himalayan region of north-east India. *Can J Microbiol.* 61(8):555–564. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0172>.
- Gonsalves D, Tripathi S, Carr JB, Suzuki JY. 2010. *Papaya ringspot virus*. The Plant Health Instructor. <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/PapayaRingspotvirus.aspx>. DOI: <https://doi.org/10.1094/phi-i-2010-1004-01>.
- Hidayat SH, Nurulita S, Wiyono S. 2012. Infeksi *Papaya ringspot virus* pada tanaman pepaya di Provinsi Nanggroe Aceh Darussalam. *J Fitopatol Indones.* 8(6):184–187. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.8.6.184>.
- Huet H, Gal-On A, Meir E, Lecoq H, Raccach B. 1994. Mutations in the helper component protease gene of *Zucchini yellow mosaic virus* affect its ability to mediate aphid transmissibility. *J Gen Virol.* 75(6):1407–1414. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-6-1407>.
- Jamous RM, Boonrod K, Fuellgrabe MW, Ali-Shtayeh MS, Krczal G, Wassenegger M. 2011. The helper component proteinase of the *Zucchini yellow mosaic virus* inhibits the hua enhancer 1 methyltransferase activity in vitro. *J Gen Virol.* 92:2222–2226. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.031534-0>.
- Juan M, Qin-sheng G, Shi-ming L, Liu PB, Li-feng, Yan-ping T, Li L. 2007. Dot-blot hybridization for detection of five Cucurbit viruses by digoxigenin-labelled cDNA probes. *Agric Sci China.* 6(12):1450–1455. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60007-3](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60007-3).
- Kalleshwaraswamy C, Krishna Kumar N, Dinesh M, Chandrashekar K, Manjunatha M. 2009. Evaluation of insecticides and oils on aphid vectors for the management of *Papaya ringspot virus* (PRSV). *Karnataka J Agric Sci.* 22(3):552–553.
- [Kementan] Kementerian Pertanian. 2015. Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 51 Tahun 2015 tentang Perubahan Atas Peraturan Menteri Pertanian Nomor 93 Tahun 2011 tentang Jenis Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina. Jakarta (ID): Kementan.
- Leary JJ, Brigati DJ, Ward DC. 1983. Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *PNAS.* 80(13):4045–4049. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.80.13.4045>.

- Nageswara-Rao M, Miyata S, Ghosh D, Ireya M, Garnsey SM, Gowda S. 2013. Development of rapid, sensitive and non-radioactive tissue-blot diagnostic method for the detection of citrus greening. *Mol Cell Probes*. 27(5–6):176–183. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2013.04.003>.
- Sahana N, Kaur H, Jain RK, Palukaitis P, Canto T, Praveen S. 2014. The asparagine residue in the FRNK box of potyviral helper-component protease is critical for its small RNA binding and subcellular localization. *J Gen Virol*. 95(5):1167–77. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.060269-0>.
- Sharma SK, Tripathi S. 2014. *Papaya ringspot virus-P*: overcoming limitations of resistance breeding in *Carica papaya* L. Di dalam: Gaur RK, Hohn T, Sharma P, editor. *Plant Virus-Host Interaction*, 1st Ed: *Molecular Approaches and Viral Evolution*. Oxford (GB): Academic Pr. hlm 177–194.
- Tolmasky ME, Actis LA, Welch TJ, Crosa JH. 2007. Plasmid. Di dalam: Reddy C, Beveridge TJ, Breznak JA dan Marzluf G, editor. *Methods For General And Molecular Microbiology*. Washington (US): ASM Press.
- Tuo D, Shen W, Yang Y, Yan P, Li X, Zhou P. 2014. Development and validation of a multiplex reverse transcription PCR assay for simultaneous detection of three papaya viruses. *Viruses*. 6:3893–3906. DOI: <https://doi.org/10.3390/v6103893>.
- Wong MY, Smart CD. 2012. A new application using a chromogenic assay in a plant pathogen DNA macroarray detection system. *Plant Dis*. 96(9):1365–1371. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-11-0593-SR>.
- Yamagishi N, Terauchi H, Honda K, Kanematsu S, Hidaka S. 2006. Discrimination of four soybean dwarf virus strains by dot-blot hybridization with specific probes. *J Virol Methods*. 133(2):219–222. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.10.028>.
- Yeh S-D, Gonsalves D, Provvidenti R. 1984. Comparative studies on host range and serology of *Papaya ringspot virus* and *Watermelon mosaic virus 1*. *Phytopathology*. 74(9):1081–1085. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-74-1081>.
- Zhou M-Y, Gomez-Sanchez CE. 2000. Universal TA cloning. *Curr Issues Mol Bio*. 2(1):1–7.