

Deteksi Molekular Bakteri Endofit pada Jaringan Planlet Tebu

Molecular Detection of Endophytic Bacteria on Plantlet Tissue of Sugarcane

WIWIK EKO WIDAYATI^{1*}, JOKO WIDADA², JOEDORO SOEDARSONO²

¹Indonesian Sugar Research Institute, Jalan Pahlawan 25, Pasuruan 67126, Indonesia

²Faculty of Agriculture, Gadjah Mada University, Jalan Bulaksumur, Yogyakarta 55281, Indonesia

Received July 19, 2007/Accepted December 18, 2007

Endophytic bacteria live in plant host tissues without causing any symptoms. The aim of this study was to examine the indigenous endophytic bacteria on sugarcane plantlets produced from the young leaf cells by using tissue culture techniques. To detect the existence of endophytic bacteria in the plantlet tissue, a series of molecular method based on PCR were applied by using ribosomal intergenic spacer (RIS) primer followed by 16S rDNA partial sequence and single strand conformation polymorphism (SSCP). The results showed that the molecular method could detect the existence of bacteria in the tissues. Using the same methods, the bacteria were also found in other developmental stages of sugarcane (explants, differentiated tissues and callus).

Key words: endophytic bacteria, PCR, RIS, 16S rDNA, SSCP

PENDAHULUAN

Akhir-akhir ini banyak metode biomolekular yang memungkinkan untuk memonitor komunitas bakteri di alam tanpa diperlukan tahap isolasi dan kultivasi, yaitu dengan membuat sidik jari komunitas DNA (Ranjard *et al.* 2000). Sekuen DNA yang saat ini sering digunakan untuk memantau komunitas bakteri di alam adalah gen yang berhubungan dengan operon ribosomal (Ranjard *et al.* 2000). Sekuen gen 16S rRNA saat ini banyak digunakan untuk mempelajari keanekaragaman mikroba di alam (Griffiths *et al.* 2000). Jumlah spesies di dalam suatu komunitas (*species richness*) dan ukuran populasi spesies di dalam suatu komunitas (*species evenness*) merupakan dua parameter penting dalam menentukan struktur dan keanekaragaman dalam suatu komunitas (Liu *et al.* 1997). Penggunaan teknik *Amplified rDNA Restriction Analysis* (ARDRA) mempunyai keterbatasan yaitu tidak dapat menunjukkan kekerabatan dan juga tidak dapat untuk memperkirakan jumlah spesies di dalam suatu komunitas dan ukuran populasi spesies di dalam suatu komunitas (Liu *et al.* 1997).

Penggunaan sekuen 16S rRNA memiliki kelemahan karena kadang-kadang kurang dapat membedakan dengan jelas suatu spesies dalam level genus. Beberapa bakteri memiliki sifat fisiologis yang berbeda tetapi memiliki sekuen 16S rRNA yang sama. Berbeda dengan sekuen 16S rRNA, sekuen di antara 16S-23S rDNA yang dikenal dengan *ribosomal intergenic spacer* (RIS) memiliki panjang sekuen yang berbeda untuk masing-masing spesies, sehingga sekuen RIS dapat digunakan sebagai penanda untuk membedakan spesies dan strain dalam suatu spesies (Yu & Mohn 2001). Sekuen RIS juga dapat digunakan untuk mengungkap struktur komunitas bakteri di

alam dengan cara membandingkan secara kualitatif pola pita yang dihasilkan dari pemisahan ampikon RIS pada agarose atau poliakrilamid. Pada akhirnya, analisis sekuen 16S rDNA yang merupakan bagian sekuen RIS dapat digunakan untuk mengetahui identitas bakteri dalam komunitas tersebut (Yu & Mohn 2001). Di samping itu, untuk mengetahui jenis bakteri dapat dilakukan dengan menggunakan metode *single strand conformation polymorphism* (SSCP). Prinsip metode ini adalah pita tunggal DNA akan memberikan konformasi yang berbeda, dan perubahan konformasi pita tunggal DNA yang disebabkan adanya perubahan basa tunggal dapat dideteksi dengan perubahan laju migrasi pada *nondenaturing polyacrylamid gel* (Qian & Germino 1999). Sidik jari DNA komunitas bakteri dengan metode biomolekular di atas lebih baik daripada metode menggunakan tahap isolasi dan kultivasi. Oleh karena itu, metode ini akan dicoba untuk mengetahui komunitas bakteri endofit dalam tebu.

Saat ini bibit tebu banyak diperbanyak secara *in vitro*, karena bibit tebu yang dihasilkan lebih berkualitas, seragam, dan sehat. Perbanyakan *in vitro* dilakukan dengan menggunakan jaringan meristem apikal tebu. Sementara itu, kehadiran bakteri endofit yang bersifat diazotrof dalam tanaman tebu sudah dibuktikan oleh banyak peneliti (Boonjawat *et al.* 1991; Dong *et al.* 1994; Muthukumarasamy *et al.* 2002), dan bahkan bentuk asosiasi ini dikategorikan sebagai *obligate endophyte* (Boddey *et al.* 1991). Sifat *obligate endophyte* bakteri diazotrof pada tebu ditunjukkan oleh persistensi bakteri dalam jaringan tebu, yaitu bakteri tersebut akan tetap terbawa dalam jaringan tebu walaupun tebu telah diperbanyak secara vegetatif.

Penelitian ini bertujuan mengetahui persistensi bakteri endofit pada tebu dengan mengetahui kehadirannya pada setiap fase pertumbuhan tebu yang diperbanyak dengan kultur jaringan dengan sidik jari DNA menggunakan sekuen RIS.

*Corresponding author. Phone: +62-343-421086,
Fax: +62-343-421178, E-mail: w_e_widayati@yahoo.com

BAHAN DAN METODE

Bahan tanaman diperoleh dari laboratorium kultur jaringan Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI) Pasuruan.

Isolasi DNA Genom Tebu. Tebu yang diperbanyak secara *in vitro* diambil pada empat tahap pertumbuhan yaitu eksplan, kalus, diferensiasi, dan planlet. Nitrogen cair ditambahkan ke bahan tanaman kurang lebih 100-150 mg, kemudian dengan mortar bahan tanaman tersebut segera dilumatkan menjadi tepung halus. Selanjutnya isolasi DNA genom tebu dilakukan menurut Honeycutt *et al.* (1992). Pelet DNA yang diperoleh dilarutkan dalam 300 μ l d H₂O dan dapat disimpan dalam freezer sampai digunakan lebih lanjut.

Untuk mengetahui kondisi DNA yang diperoleh dilakukan dengan metode elektroforesis dengan menggunakan gel agarose 1%, dan bufer TAE 1x. Marker yang digunakan adalah 1 kb *DNA ladder* (Promega no. cat. G 5711).

Amplifikasi Sekuen Ribosome Intergenic Spacer (RIS) (Ranjard *et al.* 2000). Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan *Ready To Go* (Promega) Kit. Dalam satu reaksi *ready to go* ditambahkan DNA cetakan 2.5 μ l, 1 μ l Primer S926f 30 pmol, 1 μ l primer L189r 30 pmol dan 20.5 μ l dH₂O. Urutan basa Primer S926f adalah (5'-CTYAAAKGAATTG ACGG-3', posisi 910-926 gen dari 16S rRNA *E. coli*), sedang urutan basa primer L189r (5'-TACTGAGATGYTTMARTTC-3', posisi 189-207 gen 23S rRNA *E. coli*) (Yu & Mohn 2001). Amplifikasi sekuen RIS dilakukan dengan menggunakan *Mastercycler personal*, Eppendorf dengan kondisi: denaturasi awal DNA cetakan 95 °C selama lima menit; diikuti dengan 35 siklus yang terdiri atas: denaturasi (1 menit pada suhu 95 °C), penempelan primer (1 menit pada suhu 50 °C), polimerisasi (2 menit pada suhu 72 °C); dan pada akhir siklus, polimerisasi dilanjutkan pada suhu 72 °C selama enam menit, kemudian suhu diatur pada 4 °C dan siap untuk dilihat hasilnya. DNA hasil amplifikasi divisualisasi dengan elektroforesis pada gel agarose (Sigma) 1% (b/v) dengan marker 1 kb *DNA ladder* (Promega no. cat. G 5711).

Amplifikasi Sekuen Partial 16S rDNA. Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan *Ready To Go* (Promega) Kit. Pita DNA target yang terdapat pada agarose (hasil amplifikasi menggunakan primer RIS) dipotong dan diletakkan pada parafilm, kemudian didinginkan pada suhu -20 °C selama satu jam. Potongan agarose yang mengandung pita target yang telah membeku tersebut, ditekan sehingga keluar cairannya. Cairan inilah yang digunakan sebagai DNA cetakan pada amplifikasi menggunakan *partial primer* 16S rDNA (Widayati 2005). Primer yang digunakan dalam amplifikasi ini adalah 1 μ l 30 pmol primer W5f dan 1 μ l 30 pmol W2r. Primer W5f (5'-GCAACGAGCGCAACCC-3') (posisi 1114 gen 16S rRNA *E. coli*) sedang primer W2r (5'-TACCTTGTTACGAC TTCACCCAGTC-3') berada pada posisi 1482-1507 gen 16S rRNA *E. coli* (Johnson 1994). Alat dan kondisi amplifikasi yang digunakan mirip dengan kondisi amplifikasi yang menggunakan primer RIS, kecuali suhu *annealing*, yaitu suhu yang digunakan adalah 57 °C.

Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) (Qian & Germino 1999). Produk amplifikasi sekuen partial 16S rDNA di *loading* pada gel poliakrilamid 10%. Untuk satu

gel yang berukuran 15 x 12.5 cm dibutuhkan 20 ml campuran akrilamid yang terdiri dari 6.6 ml poliakrilamid 30% (b/v) (campuran akrilamid:bisakrilamid = 49:1), 2 ml TBE 10x, 2 ml gliserol 99%, 180 μ l amonium persulfat 10% (b/v), 20 μ l TEMED dan 9.2 ml dH₂O. *Formamide dye* (95% (v/v) formamida, 20 mM EDTA, 0.05% (b/v) *bromophenol blue* dan 0.05% (b/v) *xylene cyanol*) digunakan sebagai denaturan. Produk PCR yang menggunakan primer W5f dan W2r dicampur dengan formamida, kemudian dipanaskan 10 menit. Campuran tersebut setelah dipanaskan segera dimasukkan ke dalam es. Sebanyak 5 μ l campuran dimasukkan ke dalam tiap sumur dan elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 mV selama lima jam.

Pewarnaan Perak Nitrat (*Silver staining*). Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan dengan pewarnaan perak nitrat. Proses pewarnaan dimulai dengan merendam gel dalam larutan asam asetat 10% selama \pm 40 menit dengan digoyang perlahan. Pada akhir waktu perendaman, larutan asam asetat 10% dibuang dan gel dibilas tiga kali, kemudian gel direndam pada larutan perak nitrat (0.15% AgNO₃; 0.056% (v/v) formaldehida) selama 35 menit. Selanjutnya gel dibilas kembali dengan akuades dan direndam tiga kali dalam larutan pengembang (3% Na₂CO₃; 400 μ g/l Na₂S₂O₃; 0.056% formaldehida), sampai diperoleh visualisasi yang diinginkan. Reaksi dihentikan dengan penambahan asam asetat 10% (Sambrook *et al.* 1989). Hasil pewarnaan difoto dengan menggunakan kamera digital.

HASIL

Beberapa tahapan pertumbuhan tebu pada perbanyak *in vitro* yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksplan, kalus, diferensiasi dan planlet (Gambar 1). Planlet merupakan bibit tebu hasil perbanyak secara *in vitro*.

Visualisasi DNA total tebu pada agarose 1% (v/v) memperlihatkan bahwa DNA genom tanaman dapat diisolasi dengan baik menggunakan metode yang digunakan (Gambar 2). Dengan demikian, diharapkan DNA genom bakteri endofit juga terisolasi.

DNA total yang berhasil diperoleh selanjutnya digunakan sebagai cetakan untuk amplifikasi sekuen DNA dengan menggunakan primer RIS. Visualisasi hasil elektroforesis ampikon PCR yang menggunakan primer RIS menghasilkan pola pita DNA panjang sekuen *polimorfisme* RIS (RIS-LP, *ribosome intergenic spacer length polymorphism*) (Gambar 3a). Pita yang terbentuk berkisar antara 750-1000 bp. Pada gambar 3a tampak bahwa dari keempat fase pertumbuhan kultur jaringan pola pita RIS-LP nya sama.

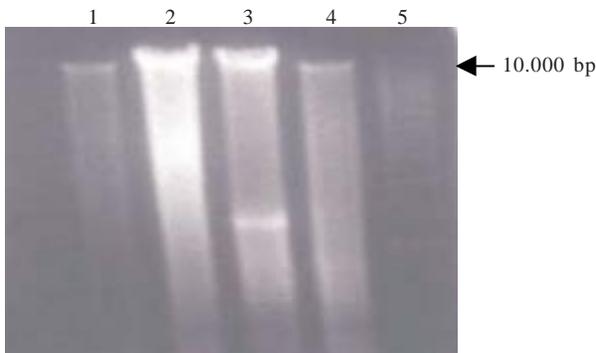
Visualisasi hasil amplifikasi sekuen *partial* 16S rDNA menunjukkan bahwa sekuen DNA hasil amplifikasi menunjukkan ukuran yang sama yaitu berkisar \pm 400 bp (Gambar 3b). Panjang sekuen DNA ini sesuai dengan panjang nukleotida yang diamplifikasi dengan menggunakan primer W2W5. Adanya pita sekuen 16S rDNA yang tervisualisasi pada agarose, menunjukkan bahwa dalam planlet tebu secara spesifik terdapat genom bakteri.

Untuk mengetahui penyusun pita sekuen *partial* 16S rDNA ini (sekuen W2W5) terdiri atas satu jenis bakteri atau

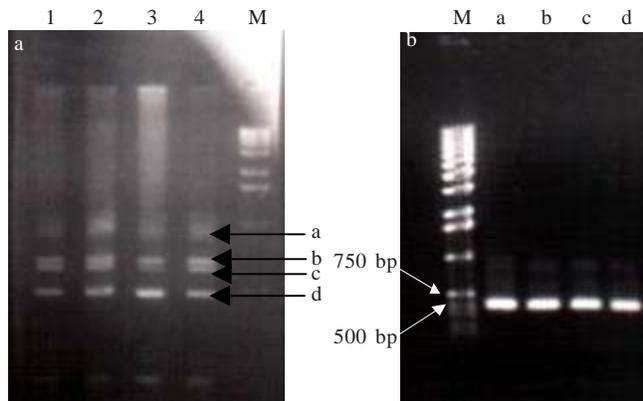
lebih maka dilakukan analisis SSCP yang menunjukkan beberapa pita yang terbagi pada daerah utas tunggal (*single strand*) dan utas ganda (*double strand*) (Gambar 4). Prinsip metode SSCP adalah utas tunggal DNA akan memberikan konformasi yang berbeda dan perubahan konformasi utas tunggal DNA yang disebabkan adanya perubahan basa



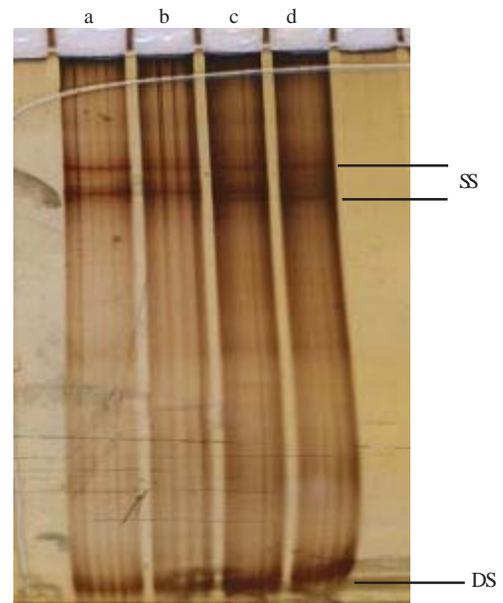
Gambar 1. Tahapan pertumbuhan tebu pada perbanyakan *in vitro*. 1: eksplan, 2: kalus, 3: diferensiasi, dan 4: planlet.



Gambar 2. DNA Genom planlet tebu. 1: DNA eksplan, 2: DNA kalus, 3: DNA diferensiasi, 4: DNA planlet, dan 5: *Marker* 1 kb ladder (Promega).



Gambar 3. Hasil visualisasi amplicon *ribosome intergenic spacer length polimorphisms* (RIS-LP) pada agarose 0.8% (a) Empat tahap pertumbuhan, berturut-turut: lajur 1: Fase eksplan, lajur 2: Fase kalus, lajur 3: Fase diferensiasi, lajur 4: Fase Planlet, dan M: adalah penanda 1 kb (Promega). (b) visualisasi hasil elektroforesis amplicon PCR yang menggunakan primer W2W5 (sekuen *partial* 16S rDNA) pada agarose 0.7%. a, b, c, dan d adalah posisi pita yang digunakan sebagai cetakan untuk amplifikasi dengan primer parsial 16S rDNA.



Gambar 4. Visualisasi SSCP amplicon PCR dengan primer W2W5 pada nondenaturing PAGE 10%. SS: adalah daerah pemisahan untuk utas tunggal, DS: adalah daerah pemisahan untuk utas ganda. a, b, c, dan d menunjukkan asal cetakan DNA yang berdasarkan posisi pita pada RIS-LP.

tunggal dapat dideteksi dengan perubahan laju migrasi pada *nondenaturing polyacrylamid gel* (Qian & Germino 1999).

Pada daerah utas tunggal terlihat dua pita yang berdekatan. Hal ini menunjukkan bahwa sekuen *partial* 16S rDNA yang dielektroforesis, terpisah menjadi dua utas tunggal. Laju migrasi utas tunggal DNA yang sama dari setiap perlakuan ini mengindikasikan bahwa sekuen *partial* 16S rDNA tersebut terdiri dari satu jenis bakteri.

PEMBAHASAN

Keanekaragaman komunitas bakteri dalam suatu lingkungan dapat dideteksi berdasarkan komposisi DNA-nya. Terdapat perbedaan yang besar antara *culture dependent method* dengan *culture independent method*. Pada *culture dependent method*, bakteri diisolasi dari sampel dan DNA diperoleh dari kultur bakteri, sedangkan pada *culture independent method*, DNA diisolasi langsung dari sampel. Keuntungan ekstraksi DNA langsung dari sampel adalah dapat diperolehnya komposisi DNA nyata yang terdapat dalam sampel sedangkan pada *culture dependent method*, DNA hanya diperoleh dari kultur bakteri yang berhasil ditumbuhkan pada media selektif (Watanabe *et al.* 1998). Menurut Miller *et al.* (1999) keberhasilan ekstraksi DNA dari sampel sangat menentukan validitas penggunaan metode molekular untuk mengetahui komunitas bakteri.

Perbanyakan tebu secara *in vitro* dilakukan dengan menggunakan jaringan pucuk tebu sebagai eksplan. Sebanyak empat tahap perkembangan kultur sel tanaman pada mikropropagasi (eksplan, kalus, diferensiasi, dan planlet) digunakan untuk mengetahui persistensi bakteri endofit dalam jaringan tebu. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa planlet tebu yang merupakan hasil mikropropagasi tidak bebas 100% dari bakteri. Bakteri tersebut diyakini berasal dari jaringan

meristem (pucuk tebu) yang digunakan sebagai eksplan. Hal ini ditunjukkan dengan teknik analisis RIS.

Analisis RIS digunakan untuk mengetahui keanekaragaman komunitas bakteri endofit dalam planlet. Hasil amplifikasi sekuen RIS menunjukkan bahwa pola RIS-LP pada setiap fase perbanyakan tebu dengan mikropopagasi adalah sama. Hal ini menunjukkan bahwa jenis bakteri yang ada pada setiap fase pertumbuhan tebu adalah sama. Diduga bakteri endofit tersebut berasal dari jaringan tebu yang digunakan untuk *explant*, artinya distribusi bakteri endofit juga mencapai pada jaringan tebu yang embriogenik.

Adanya bakteri endofit dalam jaringan tebu didukung oleh penelitian Boddey *et al.* (1991) bahwa pada tanaman tebu terjadi asosiasi spesifik yang dikategorikan sebagai endofitik obligat dengan bakteri diazotrof. Bentuk asosiasi endofitik obligat ini menunjuk pada kemampuan bakteri diazotrof yang hidup dalam jaringan tanaman tebu yang menyebar baik pada akar, batang dan daun, serta tidak membentuk struktur khusus atau serupa bintil (Boonjawat *et al.* 1991; Dong *et al.* 1994; Muthukumarasamy *et al.* 2002). Hasil penelitian ini menunjukkan adanya bakteri endofit dalam tebu tetapi tidak mengungkap sifat diazotrof dari bakteri endofit tersebut.

Sekuen di antara 16S-23S rDNA yang dikenal dengan *ribosomal intergenic spacer* (RIS) memiliki panjang sekuen yang berbeda untuk masing-masing spesies, sehingga sekuen RIS dapat digunakan sebagai penanda untuk membedakan spesies dan strain dalam suatu spesies (Yu & Mohn 2001). Pada hasil penelitian ini terlihat adanya konsistensi hasil pada pola RIS dengan hasil SSCP dari masing masing DNA genom tebu yang diisolasi dari empat tahap pertumbuhan tebu secara mikropopagasi. Pola RIS yang sama, didukung dengan pola SSCP yang sama menunjukkan bahwa bakteri yang berada pada keempat contoh DNA genom tebu diduga kuat merupakan jenis yang sama.

Fenomena lain yang muncul dari hasil penelitian ini adalah perbanyakan tebu dengan mikropopagasi tidak selalu menghasilkan bibit tebu yang steril atau benar-benar terbebas dari mikroba seperti yang telah disebutkan oleh beberapa peneliti bahwa teknik mikropopagasi tebu mampu menghasilkan tanaman yang secara genetis seragam, dan terbebas hama penyakit (Sugiyarta 1993; Gosal *et al.* 1998; Cheema & Hussain 2004). Pada perbanyakan *in vitro*, selain mampu mengurangi/membebasakan planlet dari patogen, juga dapat menghilangkan mikroflora endofit yang menguntungkan tebu (Oliveira *et al.* 2002). Padahal telah diketahui beberapa bakteri diazotrof endofit merupakan komunitas yang menguntungkan bagi pertumbuhan tebu (Rennie *et al.* 1982; Boddey *et al.* 1995; Olivares *et al.* 1996; Boddey *et al.* 2003; Muthukumarasamy *et al.* 2002; Dong *et al.* 2003). Fakta ini membuka peluang untuk meningkatkan kualitas bibit tebu yang dihasilkan melalui teknik mikropopagasi dengan pengkayaan dengan bakteri diazotrof endofit.

Dari kajian deteksi molekular bakteri endofit dapat disimpulkan bahwa kehadiran bakteri endofit di dalam jaringan planlet dapat dideteksi dengan teknik analisis RIS. Berdasarkan pola RIS dan pola SSCP yang sama dari keempat contoh DNA genom tebu dapat diduga kuat bakteri endofitnya adalah berjenis sama. Kenyataan ini membuktikan adanya persistensi

bakteri endofit dalam jaringan tebu. Rangkaian metode molekular ini memiliki peluang pula untuk digunakan sebagai metode deteksi dini bagi kehadiran suatu mikroba misalnya bakteri penyebab penyakit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Publikasi ini merupakan bagian dari kegiatan penelitian riset unggulan terpadu (RUT) IX, dan ucapan terima kasih diberikan kepada Menteri Ristek atas pendanaan penelitian RUT IX dengan judul Kajian Interaksi Asosiatif antara Bakteri Endofit Diazotrof dengan Tanaman Tebu dengan Penanggungjawab Utama Joedoro Soedarsono.

DAFTAR PUSTAKA

- Boddey RM *et al.* 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: Contributions and prospects for improvement. *Plant Soil* 174:195-209.
- Boddey RM, Urquiaga S, Alves BJR, Reis V. 2003. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant Soil* 252:139-149.
- Boddey RM, Urquiaga S, Reis V, Dobreiner J. 1991. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane. In: Polsinelli M, Materassi R, Vincenzini M (eds). *Nitrogen Fixation*. London: Kluwer Acad. p 105-111.
- Boonjawat J *et al.* 1991. Biology of nitrogen fixing rhizobacteria. In: Polsinelli M, Materassi R, Vincenzini M (eds). *Nitrogen Fixation*. London: Kluwer Acad. p 97-103.
- Cheema KL, Hussain M. 2004. Micropropagation of sugarcane through apical bud and axillary bud. *Int J Agri Biol* 6:257-259.
- Dong Y, Iniguez AL, Ahmer BM, Triplett EW. 2003. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. *Appl Environ Microbiol* 69:1783-1790.
- Dong Z *et al.* 1994. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. *Plant Physiol* 105:1139-1147.
- Gosal SS, Thind KL, Dhaliwal HS. 1998. Micropropagation of sugarcane an efficient protocol for commercial plant production. *Crop Improv* 2:167-171.
- Griffiths RI, Whiteley AS, O'donnell AG, Bailey MJ. 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Appl Environ Microbiol* 66:5488-5491.
- Honeycutt RJ, Sobral BWS, Keim P, Irvine JE. 1992. A rapid DNA extraction method for sugarcane and its relatives. *Plant Mol Biol Reporter* 10:66-72.
- Johnson JL. 1994. Similarity Analysis of rRNAs. In: Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR (eds). *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington: American Society for Microbiology.
- Liu, Wen-Tso, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63:4516-4522.
- Miller DN, Bryant JE, Madsen EL, Ghiorse WC. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol* 65:4715-4724.
- Muthukumarasamy R, Revathi G, Seshadri S, Lakshminarasimhan C. 2002. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropic. *Curr Sci* 83:137-145.
- Olivares FL, Baldani VLD, Reis VM, Baldani JJ, Dobreiner J. 1996. Occurrence of the endophytic diazotroph *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves, predominantly of gramineae. *Biol Fertil Soils* 21:197-200.

- Oliveira ALM, Urquiaga S, Dobereiner J, Baldani JI. 2002. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant Soil* 242:205-215.
- Qian F, Germino GG. 1999. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. In: Hildebrandt F, Igarashi P (eds). *Techniques in Molecular Medicine*. Berlin: Springer-Verlag.
- Ranjard L, Brothier E, Nazaret S. 2000. Sequencing bands of ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints for characterization and microscale distribution of soil bacterium populations responding to mercury spiking. *Appl Environ Microbiol* 63:5334-5339.
- Rennie RJ, de Freitas JR, Ruschel AP, Vose PB. 1982. Isolation and identification of N₂-fixing bacteria associated with sugarcane (*Saccharum* sp.). *Can J Microbiol* 28:462-467.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Second Edition. United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Pr.
- Sugiyarta E. 1993. Teknologi mikropopagasi untuk penyediaan bibit tebu varietas unggul baru yang sehat. *Gula Indonesia XVIII*:15-16.
- Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, Harayama S. 1998. Molecular detection, isolation and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* 64:4396-4402.
- Widayati WE. 2005. Bakteri Diazotrof Endofit Pada Tanaman Tebu (*Saccharum Officinarum* L.): Identifikasi dan Mekanisme Asosiasi. [Dissertation]. Yogyakarta: Univ. Gadjah Mada.
- Yu Z, Mohn WW. 2001. Bacterial diversity and community structure in an aerated lagoon revealed by ribosomal DNA sequencing. *Appl Environ Microbiol* 67:1565-1574.