

Transfer Gen *inaZ* pada Beberapa Galur *Bradyrhizobium japonicum* Toleran Asam-Al

(Transfer of *inaZ* Gene to Acid-Al Tolerant Strains of *Bradyrhizobium japonicum*)

FARIDA ARIYANI, TEDJA IMAS*, DAN ARIS TRI WAHYUDI

Jurusan Biologi FMIPA IPB, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

Diterima 4 November 1998/Disetujui 26 Oktober 1999

The objective of this research was to study the expression of *ice nucleation gene (inaZ)* in several *Bradyrhizobium japonicum* acid-Al tolerant strains in free living and bacteroid stage. The test strains, i.e. 05, 09, 15, 32, 38, and 45 were grown in yeast mannitol agar (YMA) supplemented with 100 µg/ml rifampicin (Rif) while *Escherichia coli* in luria agar (LA) with 250 µg/ml kanamycin (Kan). The conjugation frequency was 1.8×10^8 to 1.3×10^8 per recipient. All exconjugant of strains 05, 09, 15, 38 were able to show ice nucleation activity while strains 32, 45 showed partial activity i.e. 40% and 60% ice nucleation activity each. The root nodules formed were not related with the ice nucleation ability. The bacteroid stage of all exconjugant suspensions were able to grow on YMA + Congo red (CR) + Rif but only six of them could grow on YMA + CR + Rif + Kan.

PENDAHULUAN

Dua puluh satu galur *Bradyrhizobium japonicum* toleran asam-Al telah berhasil diperoleh Enderini (1995) dan Fitri (1995) melalui seleksi kemampuan tumbuh 50 galur pada media selektif dalam lingkungan pH 4.5 dan konsentrasi Al 50 µM. Galur-galur tersebut diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai simbiosis kedelai di tanah asam, namun kemampuan hidup bakteri tersebut di lingkungan alami dan kompetisinya terhadap bakteri lain belum ditelaah. Telaah untuk membedakan bakteri introduksi dengan bakteri alami memerlukan suatu penanda yang bersifat stabil.

Menurut Bushby (1982) penanda molekul dapat diandalkan dan penerapannya mudah. Salah satu penanda molekul yang sering digunakan ialah gen *inaZ*. Gen tersebut menyandikan protein yang mampu membentuk inti kristal es pada suhu di bawah titik beku (Lindow 1990). Asai gen *inaZ* menunjukkan kepekaan yang tinggi dan dapat dilakukan tanpa substrat radioaktif dan peralatan yang mahal (Lindgren *et al.* 1989).

Bradyrhizobium japonicum juga diketahui tidak memiliki plasmid endogen sehingga seluruh gennya terletak pada kromosom (Barbour *et al.* 1992). Konjugasi yang melibatkan plasmid donor pJL1703 dari *E. coli* DH5α, *B. japonicum* sebagai resipien dan plasmid penolong (*helper*) dari *E. coli* HB101 dikenal sebagai konjugasi tiga tetua (Ditta *et al.* 1980). Seleksi hasil konjugasi dilakukan dengan menumbuhkan koloni pada media seleksi (Brock & Madigan 1988).

Bakteri yang memiliki gen *inaZ* menunjukkan kemampuan yang beragam dalam membentuk inti es pada suhu yang berbeda. Sebagian kecil bakteri aktif membentuk inti

es pada suhu -4.4°C atau lebih, sedangkan sebagian besar pada suhu -8°C atau lebih rendah (Turner *et al.* 1991). Hal lain yang mempengaruhi frekuensi pembentukan inti es ialah umur bakteri dan jenis media tumbuh. Bakteri yang ditumbuhkan pada media padat mampu mengekspresikan pembentukan inti es dengan baik (Lindow 1990).

Pada umumnya bakteri Gram negatif dapat mengekspresikan gen *inaZ* (Lindgren *et al.* 1989). Wahyudi *et al.* (1998) berhasil memindahkan gen *inaZ* ke dalam beberapa galur *B. japonicum* toleran asam-Al melalui teknik konjugasi tiga tetua. Semua *B. japonicum* hasil konjugasi mampu mengekspresikan gen *inaZ* serta membentuk bintil akar pada tanaman siratro (*Macropodium atropurpureum*) maupun kedelai, meskipun hanya sedikit ekskonjugan bakteroid *B. japonicum* yang mampu mengekspresikan kembali gen *inaZ*. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari ekspresi gen *inaZ* pada beberapa galur *B. japonicum* toleran asam-Al hasil isolasi galur lokal asal Majalengka pada fase sel dan bakteroid.

BAHAN DAN METODE

Sumber Galur. Enam galur bakteri yang dipakai ialah *B. japonicum* toleran asam-Al hasil isolasi peneliti sebelumnya dari daerah Majalengka dengan nomor galur 05, 09, 15, 32, 38, dan 45 (Fitri 1995). Semua galur disimpan pada media agar-agar miring manitol ekstrak khamir (MEK) pada suhu 4°C. Dua galur *E. coli* yang digunakan ialah DH5α pembawa plasmid pJL1703 (Loper & Lindow 1994) dan HB101 pembawa plasmid pRK2013 (Ditta *et al.* 1980). Biakan *E. coli* disimpan pada suhu -20°C dalam kaldu Luria yang diberi larutan gliserol 20%.

Penentuan Penanda Antibiotik Galur Resipien. Sebanyak satu lup biakan kerja galur uji *B. japonicum* dan

*Penulis untuk korespondensi, Telp. 62-251-311681

E. coli masing-masing digoreskan pada media cawan yang sesuai yang mengandung antibiotik. Antibiotik yang digunakan ialah rifampisin (Dexamedica) dan kanamisin (Meiji) dengan konsentrasi masing-masing 100, 150, 200, dan 250 µg/ml. Sebagai kontrol digunakan media agar-agar tanpa antibiotik. Inokulum *E. coli* diinkubasi selama dua hari pada suhu 37°C dan *B. japonicum* diinkubasi selama tujuh hari pada suhu ruang. Pengamatan dilakukan terhadap pertumbuhan koloni galur resisten.

Transfer Gen *inaZ* dengan Konjugasi Tiga Tetua. Bakteri *E. coli* DH5a Kan' (pJL1703) digunakan sebagai donor (D) sedangkan *E. coli* HB101 Kan' pRK2013 sebagai pembantu (P). Keenam galur resipien (R) *B. japonicum* berdasarkan pengujian resisten terhadap rifampisin 100 µg/ml dan peka terhadap kanamisin 250 µg/ml. Ketiga bakteri D, P, dan R masing-masing ditumbuhkan pada 10 ml kaldu Luria (Sambrook *et al.* 1989) yang dimodifikasi untuk bakteri R yaitu jumlah NaCl yang diberikan sebesar 1 g/l dengan antibiotik yang sesuai. *Escherichia coli* diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan *B. japonicum* diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang di atas alat penggoyang dengan kecepatan 200 rpm.

Konjugasi tiga tetua dilakukan mengikuti Ditta *et al.* (1980). Lima kombinasi pelet-pelet k, D, dan P disiapkan (R, R+D, R+P, D+P, R+D+P). Ke dalam masing-masing kombinasi ditambahkan 40 ml kaldu Luria, lalu dipindahkan ke atas kertas saring dengan ukuran pori 0.45 mm yang telah diletakkan di atas permukaan cawan media agar-agar Luria tanpa antibiotik, dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Setelah diinkubasi kertas saring diambil dengan bantuan pinset secara aseptik dari cawan media agar-agar Luria dan dimasukkan ke dalam tabung mikro. Selanjutnya ditambahkan satu mililiter kaldu Luria Bertani dan dikocok dengan vorteks supaya koloni yang berada di atas kertas saring larut ke dalam kaldu, kertas saring dibuang, dan masing-masing suspensi kombinasi yang diperoleh diambil sebanyak 100 µl dan disebarkan pada media seleksi MEK yang mengandung merah kongo (MK) 0.0025%, Rif 100 mg/ml, Kan 250 µg/ml dan diinkubasi selama tujuh hari. Koloni hasil konjugasi mampu tumbuh pada media seleksi. Dalam media yang sama disebarkan biakan suspensi R, R+P, R+D, dan D+P sebagai kontrol negatif. Jumlah koloni resipien diperoleh dari suspensi R+D+P yang ditumbuhkan pada media MEK yang mengandung MK 0.0025%, dan Rif 100 µg/ml. Frekuensi konjugasi adalah nisbah jumlah koloni hasil konjugasi dengan koloni resipien.

Uji Kualitatif Inti Es Koloni Tahap I. Dari setiap eks-konjugan ditetapkan lima koloni galur uji, yang selanjutnya disebut koloni tahap I untuk diremajakan. Sandi 05.1 adalah eks-konjugan nomor 01 dari galur induk 05. Dari setiap galur eks-konjugan diambil masing-masing satu lup untuk: (i) uji kemampuan membentuk es dan (ii) inokulum tanaman siratro (10^5 sel/ml) yang telah ditumbuhkan pada media sintetik agar-agar tegak dalam tabung reaksi berukuran 200 mm x 25 mm.

Sebelum uji pembentukan inti es, bakteri diinkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam, kemudian diambil satu lup untuk dimasukkan ke dalam tabung mikro yang berisi satu

mililiter dapar fosfat 0.01 M (pH 7.0). Dari suspensi tersebut diambil 100 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 10 ml dapar fosfat yang telah diletakkan dalam *Circulating Alcohol Bath* selama 10-15 menit pada suhu -8°C. Penetapan suhu -8°C dipilih berdasarkan aktivitas pembentukan inti es terendah (Turner *et al.* 1991). Pengamatan dilakukan terhadap pembentukan es. Tabung reaksi berisi dapar fosfat yang telah diinokulasi dengan suspensi *E. coli* DH5a (pJL1703) dan suspensi galur induk *B. japonicum* masing-masing bertindak sebagai kontrol positif dan negatif.

Uji Kualitatif Inti Es Bakteroid dan Koloni Tahap II. Sebanyak 100 µl suspensi galur eks-konjugan dipindahkan secara aseptik ke dalam tabung reaksi berisi media sintetik agar-agar tegak dan kecambah siratro. Seluruh tabung tersebut ditempatkan dalam bak berisi pasir yang dikontrol suhunya melalui pembasahan pasir, dan perangkat diletakkan di rumah kaca. Setelah 21 hari semua bintil akar siratro yang dibentuk oleh setiap galur eks-konjugan masing-masing dilumatkan dalam satu mililiter larutan dapar fosfat. Dari suspensi bakteroid masing-masing diambil 100 ml untuk (i) uji kemampuan membentuk es yang menentukan kestabilan ekspresi gen *inaZ* pada fase bakteroid, (ii) penegasan koloni yang berasal dari bintil akar hasil inokulasi eks-konjugan *B. japonicum* pada media MEK + MK + Rif, dan (iii) penumbuhan pada media seleksi. Koloni yang terbentuk pada media seleksi selanjutnya disebut sebagai koloni tahap II dan disiapkan kembali untuk asai inti es seperti yang telah diuraikan sebelumnya.

HASIL

Penentuan Penanda Antibiotik. Seluruh galur *B. japonicum* yang digunakan dalam percobaan ini mampu tumbuh dalam media agar MEK yang mengandung rifampisin dengan kisaran 100-250 µg/ml. Pada kanamisin 200 µg/ml diperoleh dua galur *B. japonicum* (05 dan 09) yang mampu tumbuh, tetapi pada konsentrasi 250 µg/ml tidak satu pun galur mampu tumbuh. Hal ini menunjukkan galur-galur *B. japonicum* resisten rifampisin dan sensitif kanamisin (250 µg/ml).

Transfer Gen *inaZ* dengan Konjugasi Tiga Tetua. Frekuensi konjugasi yang diperoleh dalam penelitian ini berkisar antara 1.8×10^5 sampai dengan 1.3×10^6 per resipien dengan nilai tertinggi ditunjukkan oleh *B. japonicum* galur 45 sedangkan terendah oleh galur 09 (Tabel 1).

Tabel 1. Frekuensi konjugasi dari *E. coli* DH5α (pJL1703) dengan galur *B. japonicum* secara tiga tetua.

Konjugasi bakteri	Frekuensi
<i>B. Japonicum</i> 09 x <i>E. coli</i> DH5α (pJL 1703) x <i>E. coli</i> HB 101 (pRK2013)	1.8×10^4
<i>B. Japonicum</i> 32 x <i>E. coli</i> DH5α (pJL 1703) x <i>E. coli</i> HB 101 (pRK2013)	7.4×10^4
<i>B. Japonicum</i> 05 x <i>E. coli</i> DH5α (pJL 1703) x <i>E. coli</i> HB 101 (pRK2013)	3.26×10^7
<i>B. Japonicum</i> 15 x <i>E. coli</i> DH5α (pJL 1703) x <i>E. coli</i> HB 101 (pRK2013)	1.3×10^7
<i>B. Japonicum</i> 38 x <i>E. coli</i> DH5α (pJL 1703) x <i>E. coli</i> HB 101 (pRK2013)	2.1×10^7
<i>B. Japonicum</i> 45 x <i>E. coli</i> DH5α (pJL 1703) x <i>E. coli</i> HB 101 (pRK2013)	1.3×10^6

Tabel 2. Hasil asai kualitatif inti es.

No.	Sandi galur ekskonjugan	Asai inti es koloni tahap I	Σ Bintil	Asai inti es bakteroid	Penumbuhan suspensi bakteroid		Asai inti es koloni tahap II
					A	B	
1	05.1	+	6	-	+	+	-
2	05.2	+	5	-	+	-	-
3	05.3	+	4	-	+	+	-
4	05.4	+	3	-	+	-	-
5	05.5	+	3	-	+	-	-
6	09.1	+	3	+	+	+	+
7	09.2	+	4	-	+	-	-
8	09.3	+	4	-	+	-	-
9	09.4	+	5	-	+	-	-
10	09.5	+	4	-	+	-	-
11	15.1	+	5	-	+	-	-
12	15.2	+	3	-	+	-	-
13	15.3	+	4	-	+	-	-
14	15.4	+	4	-	+	-	-
15	15.5	+	5	+	+	-	-
16	32.1	-	3	-	+	-	-
17	32.2	-	1	-	+	-	-
18	32.3	+	4	-	+	+	-
19	32.4	+	2	-	+	-	-
20	32.5	-	3	-	+	-	-
21	38.1	+	5	-	+	-	-
22	38.2	+	4	-	+	-	-
23	38.3	+	4	-	+	-	-
24	38.4	+	5	-	+	-	-
25	38.5	+	6	-	+	-	-
26	45.1	+	6	-	+	-	-
27	45.2	-	4	-	+	-	-
28	45.3	+	7	-	+	+	-
29	45.4	-	3	-	+	-	-
30	45.5	+	7	-	+	+	-

A: Manitol Ekstrak Khamir (MEK) + merah kongo (MK) + Rifampisin (Rif), B: MEK + MK + Rif + kanamisin (Kan)

Uji Kualitatif Inti Es Koloni Tahap I. Semua ekskonjugan dari galur 05, 09, 15, 38 menunjukkan hasil positif, mampu membentuk inti es pada suhu -8°C (Tabel 2). Dua galur lainnya (galur 32 dan 45) masing-masing menunjukkan jumlah ekskonjugan sebesar 40% dan 60% yang mampu membentuk inti es pada suhu -8°C .

Uji Kualitatif Inti Es Bakteroid. Semua ekskonjugan (25 koloni) membentuk bintil akar dengan jumlah bintil berkisar antara 1-7 butir. Jumlah bintil terbesar ditunjukkan oleh ekskonjugan galur 45 dan terkecil oleh 32 (Tabel 2).

Suspensi seluruh bakteroid mampu tumbuh pada media MEK + MK + Rif, sedangkan pada media seleksi (MEK + MK + Rif + Kan) hanya enam ekskonjugan (05.1, 05.3, 09.1, 32.3, 45.3, 45.5) saja yang tumbuh (Tabel 2). Uji kualitatif inti es bakteroid menunjukkan hasil positif pada galur 09.1 dan 15.5, sebaliknya dengan ekskonjugan galur 05, 32, 38, dan 45.

Uji Kualitatif Inti Es Tahap II. Koloni tahap II adalah koloni dari sel *B. japonicum* asal bakteroid yang ditumbuhkan pada media seleksi. Koloni ini diuji kembali keaktifan pembentukan inti esnya. Dari galur-galur ekskonjugan yang mampu tumbuh pada media seleksi ternyata hanya galur ekskonjugan 09.1 yang mampu menunjukkan keaktifan pembentukan inti es kembali.

PEMBAHASAN

Frekuensi Konjugasi. Konjugasi dengan tiga tetua antara *E. coli* DH5 α (pJL1703), *E. coli* HB101 (pRK2013)

dan enam galur uji *B. japonicum* toleran asam-AI menunjukkan frekuensi konjugasi berkisar antara 1.8×10^8 sampai dengan 1.3×10^6 per resipien. Perbedaan ini diduga karena perbedaan kemampuan bakteri resipien dalam berkonjugasi dengan donor.

Asai Inti Es Koloni Tahap I. Pada asai inti es koloni tahap I ternyata semua koloni ekskonjugan 05, 09, 15, dan 38 menunjukkan hasil positif, kecuali galur ekskonjugan 32.1, 32.2, 32.5 (40%) dan 45.2, 45.4 (60%). Mengingat hanya lima koloni ekskonjugan yang dipilih, jumlah koloni ekskonjugan yang terpilih diduga turut mempengaruhi persentase asai. Dilaporkan oleh Wahyudi *et al.* (1998) bahwa semua ekskonjugan galur 11 dan 33 menunjukkan hasil positif, sedangkan galur 43 sebesar 67%. Dengan demikian galur *B. japonicum* toleran asam-AI yang membawa gen *inaZ* pada koloni tahap I ialah galur 05, 09, 15, 38, 11, 33, dan sebagian dari galur 32, 43, dan 45. Mereka menduga bahwa tidak terekspresinya gen *InaZ* pada sel akibat: (i) terintegrasinya plasmid pRK2013 (Kan^r) dalam genom *B. japonicum* yang menyebabkan resisten terhadap kanamisin, namun tidak membawa plasmid pJL1703; (ii) terjadinya mutasi spontan terhadap kanamisin; (iii) delesi pada gen *inaZ* sewaktu transfer; dan (iv) adanya elemen sisipan endogen dari *B. japonicum* pada gen *inaZ*.

Dua dari 25 galur ekskonjugan (Tabel 2) hanya mampu mengekspresikan gen *inaZ* pada fase bakteroid, sedangkan Wahyudi *et al.* (1998) melaporkan 9 dari 25 galur ekskonjugan mampu mengekspresikan gen *InaZ* pada fase

bakteroid. Gen *inaZ* dapat terekspresi dengan baik apabila faktor-faktor yang mempengaruhi ekspresi gen dapat dipenuhi, antara lain: (i) jumlah gen per kopi, (ii) kekuatan promotor transkripsi, (iii) adanya daerah pengikatan ribosom, (iv) tidak ada penghambatan katabolit, (v) kerangka pembacaan yang tepat, (vi) penggunaan kodon yang tepat, dan (vii) kemampuan mempertahankan protein yang telah diproduksi (Brock & Madigan 1988). Lebih lanjut Werner (1992) melaporkan bahwa kandungan DNA bakteroid dan sel *B. japonicum* tidak berbeda, namun bentuk bakteroid dapat dipengaruhi oleh gen tanaman inang. Dikemukakannya pula bahwa susunan asam lemak membran peribakteroid tidak berbeda dengan komposisi asam lemak pada retikulum endoplasma inang. Tidak terekspresinya gen *inaZ* pada fase bakteroid sebagian besar galur diduga dipengaruhi oleh adanya substansi tanaman inang. Adanya sel tanaman yang lebih kompak daripada sel bakteri menyebabkan ekspresi pembentukan inti es menjadi lebih lemah (Baertlein *et al.* 1992).

Uji kualitatif inti es bakteroid yang menggunakan suspensi semua bintil akar yang terbentuk dari hasil inokulasi ekskonjugan menunjukkan bahwa jumlah bintil akar tidak ada kaitan dengan kemampuan membentuk inti es. Hal ini terlihat pada galur 09.1 (membentuk 3 bintil akar) dan galur 15.5 (membentuk 5 bintil akar), masing-masing menunjukkan kemampuan membentuk inti es. Galur 45.3 dan 45.5 yang masing-masing memiliki tujuh bintil akar (terbanyak) menunjukkan asai negatif. Hal yang sama dilaporkan pula oleh Wahyudi *et al.* (1998). Dengan demikian gen *nod* yang terdapat pada kromosom *B. japonicum* tidak terganggu oleh kehadiran gen *inaZ* sebagai gen yang dipindahkan. Ciri koloni *B. japonicum* tampak kembali ketika suspensi bakteroid, baik yang menunjukkan uji inti es positif maupun negatif ditumbuhkan pada media MEK + MK + Rif 100 µg/ml (Tabel 2). Selanjutnya apabila ditumbuhkan pada media seleksi hanya koloni galur 05.1, 05.3, 09.1, 32.3, 45.3, 45.5 (20%) yang dijumpai, demikian pula galur 11.4, 11.5, 33.5, 42.7, 43.8, 43.9 (24%) seperti yang melaporkan oleh Wahyudi *et al.* (1998).

Di pihak lain suspensi bakteroid ekskonjugan yang menunjukkan hasil inti es negatif, namun positif atau tumbuh baik pada media seleksi berasal dari ekskonjugan galur 05.1, 05.3, 32.2, 45.3, 45.5 (21.7%). Wahyudi *et al.* (1998) menjumpai keadaan yang sama untuk galur 43.7, 43.8, dan 43.9 (18.8%). Dikemukakan pula plasmid pJL1703 diduga hilang sewaktu pembentukan bakteroid sehingga gen *inaZ* tidak terekspresi. Galur 15.5 yang pada fase bakteroid menunjukkan asai positif ternyata tidak mampu tumbuh kembali pada media seleksi. Galur 11.1, 11.2, 11.7, 33.2, 33.4, 43.6 juga menunjukkan keadaan yang sama (Wahyudi *et al.* 1998). Hal ini diduga karena adanya delesi pada gen kanamisin.

Asai Inti Es Koloni Tahap II. Koloni tahap II merupakan hasil penumbuhan suspensi bakteroid pada media seleksi. Koloni tahap II yang menunjukkan asai positif yaitu hanya galur 09.1. Galur 09.1 tampaknya dapat mempertahankan kehadiran gen *inaZ* sebagai gen transfer. Gen *inaZ* dapat dijumpai pada galur ekskonjugan 09.1 dalam fase sel

dan bakteroid baik pada koloni tahap I maupun II; sedangkan pada galur 15.5 gen *inaZ* hanya dijumpai pada koloni I. Dari enam galur *B. japonicum* toleran asam-Al yang diteliti dan tiga galur yang diteliti oleh Wahyudi *et al.* (1998) ternyata ada empat galur yang membawa gen *inaZ*, baik pada koloni tahap I maupun II. Oleh karena itu penanda molekuler alternatif perlu dipertimbangkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih dan penghargaan ditujukan kepada Kepala Proyek Pengembangan Riset Terpadu melalui Dekan Fakultas MIPA IPB yang telah mendanai riset ini sebagai bagian riset RUT 1.3 dengan No. 1023/SP.KD/PP II/IV/95. Terima kasih disampaikan kepada Antonius Suwanto atas izinnnya dapat menggunakan galur *E. coli* DH5α (pJL1703) dan *E. coli* HB101 (pRK2013) untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Baertlein, D.A., S.E. Lindow, N.J. Panopoulos, S.P. Lee, M.N. Midrinos & T.H.H. Chen. 1992. Expression of bacterial ice nucleation gene in plants. *Plant. Physiol.* 100:1730-1736.
- Barbour, W.M., W. Shui-ping & G. Stacey. 1992. Molecular genetics of *Bradyrhizobium* symbiotic, hlm. 647-681. Di dalam: G. Stacey, R. H. Burris & H.J. Evans (ed.), *Biological Nitrogen Fixation*. New York: Chapman & Hall.
- Brock, T.D. & M.T. Madigan. 1988. *Biology of Microorganisms*, hlm. 289-290. New Jersey: Prentice-Hall.
- Bushby, H.V.A. 1982. Direct quantitative recovery of *Rhizobium* from soil and rhizosfer, hlm. 54-56. Di dalam: J.M. Vincent (ed.), *Nitrogen Fixation in Legume*. New York: Academic Press.
- Ditta, G., S. Stanfield, D. Carbin & D.R. Helinski. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram negative bacteria: construction of gene a bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72:7346-7351.
- Endarini, T. 1995. Seleksi galur-galur *Bradyrhizobium japonicum* indigenus toleran medium asam-Al. Skripsi. Bogor: Jurusan Biologi FMIPA IPB.
- Fitri, R. 1995. Seleksi bertahap toleransi asam-Al sejumlah galur *Bradyrhizobium japonicum*. Skripsi. Bogor: Jurusan Biologi FMIPA IPB.
- Lindgren, B.P., R. Frederick, A.G. Govindarajan, N.J. Panopoulos, B.J. Stakawicz & S.E. Lindow. 1989. An ice nucleation reporter gene system: identification of inducible pathogenicity gene in *Pseudomonas syringae* p.v. *phaseolicola*. *EMBO J.* 8:1291-1301.
- Lindow, S.E. 1990. Bacterial ice nucleation activity, hlm. 428-434. Di dalam: Z. Klement, K. Rudolph & D.C. Sands (ed.), *Methods in Phytobacteriology*. Budapest: Akademiai Kiado.
- Loper, J.E. & S.E. Lindow. 1994. A biological sensor for iron available to bacteria in their habitats in plant surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1934-1941.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed. Ke-2. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Turner, M.A., F. Arellano & L.M. Kozloff. 1991. Component of ice nucleation structures of bacteria. *J. Bacteriol.* 75:6515-6572.
- Wahyudi, A.T., A. Suwanto, T. Imas & A. Tjahjoleksono. 1998. Screening of acid-aluminium tolerant *Bradyrhizobium japonicum* strains: analysis of marker genes and competitions in planta. *AsPac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 6:13-20.
- Werner, D. 1992. Physiology of nitrogen-fixing legumes nodules: compartments and functions, hlm. 399-422. Di dalam: G. Stacey, R.H. Burris & H.J. Evans (ed.), *Biological Nitrogen Fixation*. New York: Chapman & Hall.