Hayati, September 1998, hlm. 79-85
ISSN 0854-8587

Vol. 5, No. 3

Konstruksi Plasmid yang Mengandung Situs *Pac*I dan *Pme*I untuk Transposon Mutagenesis pada *Xanthomonas campestris*

(*Plasmid Construction Containing* PacI *and* PmeI *Sites for Transposon Mutagenesis in Xanthomonas campestris*)

YAYA RUKAYADI[1], ANTONIUS SUWANTO[1,2*], DAN BUDI TJAHJONO[3]

[1]*PAU Bioteknologi IPB, Jalan Puspa, Kampus Darmaga, Tromol Pos 1, Bogor 16680;*
[2]*Jurusan Biologi FMIPA IPB, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144;*
[3]*Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Faperta IPB, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144*

Diterima 21 April 1998/Disetujui 19 Agustus 1998

Mechanism of pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* (Xcg) is poorly understood. One of the reasons is the lack of information about the complete genome structure as well as the physical and genetic map of this bacterium. To facilitate construction of physical and genetic map of Xcg genome employing *Pac*I, *Pme*I, and *Swa*I, restriction enzymes that digest the genome infrequently, we require a specific transposon containing *Pac*I and *Pme*I sites. We constructed a 8.2 kb plasmid (pYR103) containing *Pac*I and *Pme*I sites in the transposon derived from pUTmini-Tn5Km carrying trimethoprim gene marker. The frequency of transconjugation was found to be 8.3 x 10^{-6} per recipient, which is consistently higher than the other transposon used in similar experiments. This recombinant plasmid might facilitate the construction of specific mutants for gene localization, molecular cloning, physical as well as genetic mapping in *X. campestris* pv. *glycines* and its related species or pathovars.

PENDAHULUAN

Mekanisme patogenisitas pada *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* (Xcg) sangat kompleks dan belum banyak diteliti sehingga belum banyak dimengerti. Hwang *et al.* (1992) telah mengidentifikasi dan mengkarakterisasi potongan DNA yang terdiri atas gen-gen yang terlibat dalam proses patogenisitas dari Xcg 8ra dengan menggunakan mutagen kimia, akan tetapi belum jelas apakah potongan DNA tersebut merupakan satu-satunya faktor penentu patogenisitas atau faktor lain terlibat karena mutagenesis kimiawi sering kali bersifat pleiotrofi.

Salah satu penyebab kurang berhasilnya pemahaman mekanisme patogenisitas pada Xcg ialah belum tersedianya informasi yang memadai mengenai organisasi struktur genom, peta fisik serta genetika yang lengkap dari bakteri tersebut. Widjaja (1996) melaporkan bahwa Xcg YR32 mempunyai satu kromosom sirkuler dengan ukuran sekitar 5020 kilo pasangan basa (kb). Selain itu Sharma *et al.* (1994) melaporkan bahwa pada Xcg ditemukan dua plasmid kriptik masing-masing berukuran 1.5 kb dan 25.0 kb.

Identifikasi dan lokalisasi gen pada suatu genom dapat dilakukan dengan cara mutagenesis transposon. Mesak *et al.* (1994) melakukan mutagenesis transposon pada Xcg dengan menggunakan sejumlah transposon, tetapi frekuensi yang didapatkan masih relatif rendah. Hal ini mungkin karena kondisi mutagenesis yang belum optimum dan ketidaksesuaian transposon yang digunakan tidak sesuai. Untuk itu, perlu diuji coba transposon lain yang dapat digunakan untuk melakukan mutagenesis transposon pada Xcg.

Widjaja (1996) telah berhasil mengkonstruksi peta fisik dan genetika kromosom Xcg YR32 menggunakan enzim restriksi *Pac*I, *Pme*I, dan *Swa*I. Enzim tersebut masing-masing memotong kromosom bakteri menjadi 3, 5, dan 5 potongan. Peta ini merupakan peta fisik dan genetika pertama, namun hasil konstruksi peta masih kasar sehingga lebih cocok sebagai peta makrorestriksi. Untuk memperhalus peta tersebut dapat dilakukan dengan cara menambahkan situs *Pac*I (5'-TTAAT'TAA-3'), *Pme*I (5'-GTTT'AAAC-3'), dan *Swa*I (5'-ATTT'AAAT-3') pada kromosom bakteri dengan menyisipkan secara acak transposon khusus yang membawa situs-situs tersebut. Untuk itu perlu dilakukan konstruksi plasmid yang mengandung situs *Pac*I dan *Pme*I untuk keperluan mutagenesis transposon pada Xcg YR32.

BAHAN DAN METODE

Galur Bakteri, Plasmid, dan Transposon. Penelitian ini menggunakan Xcg, dua galur *Escherichia coli*, transposon turunan Tn*5*, serta sejumlah plasmid (Tabel 1).

Media dan Kondisi Pertumbuhan. Galur *E. coli* dan Xcg secara rutin ditumbuhkan pada media kaldu Luria Bertani (ekstrak khamir 5 g/l; *tryptone* 10 g/l, dan NaCl 10 g/l) (LB) pH 7.2 pada suhu 37°C selama semalam untuk *E. coli* dan untuk Xcg pada suhu 28°C selama 24 jam, kecuali bila disebut khusus. Media padat yang digunakan pada penelitian ini ialah agar-agar Luria Bertani (LB + agar-agar 5 g/l) untuk pertumbuhan *E. coli* dan media agar-agar ekstrak khamir (YDC) 10 g/l, dekstrosa 5 g/l, $CaCO_3$ 20 g/l, dan agar-agar 15 g/l) untuk pertumbuhan Xcg. Antibiotika yang

* Penulis untuk korespondensi, Fax. 62-251-621724,
E-mail: asuwanto@indo.net.id

Tabel 1. Galur bakteri, plasmid, dan transposon yang digunakan.

Galur bakteri dan plasmid	Genotipe	Referensi
X. campestris pv. *glycines* YR32	Tipe liar	Rukayadi (1995)
E. coli		
S17-1λpir	$Pro^-Res^-Mod^+$ *recA*, terintegrasi RP-4Tc::Mu-Km: :Tn7, dilisogeni dengan fag λpir	Simon *et al.* (1983)
DH5α	F^- *lacZ*ΔM15, *recA*, *hsdR*17, *gyrA*, *thi*⁻	Sambrook *et al.* (1989)
Plasmid dan transposon		
pRK2013	ColE1 replicon, Tra^+ dari RK2, Km^r	Ditta *et al.* (1980)
pUTmini-Tn*5*Sp/Sm	mini-Tn5SP/Sm: Sp/Sm^R, *tnp* ⁻, Ap^r, *ori* RGK, *mob*RP4.	Herrero *et al.* (1990)
pUCD623	Tn*4431*, Tc^R	Shaw *et al.* (1988)
pUTmini-Tn*5*Km	mini-Tn5Km1: Km^R, *tnp* ⁺, Ap^r, *ori* RGK, *mob*RP4.	Rostas *et al.* (1984)
pEP4351	Tn*4351*, Tc^R	Shoemaker *et al.* (1986)
pNEB193	Ap^R, ColE1, *lacZ*	Guan (1995)
pUC18*Not*I	pUC18 dengan *mcs* situs *Not*I	Herrero *et al.* (1990)
pAS396	Tp^R	Suwanto (belum dipublikasi)
pYR101	pNEB193 - TP^R	Penelitian ini
pYR102	pUC18*Not*I - TP^R	Penelitian ini
pYR103	pUTmini-Tn*5*Km^R - TP^R	Penelitian ini

digunakan dalam media ialah rifampisin (Rf) 100 μg/ml, trimetoprim (Tp) 50 μg/ml, ampisilin (Ap) 100 μg/ml, dan kanamisin (Km) 25 μg/ml.

Penyiapan Suspensi Bakteri. Koloni tunggal dari *E. coli* atau Xcg masing-masing ditumbuhkan dalam 10 ml LB (pH 7.2) yang ditambahi antibiotika yang sesuai pada suhu masing-masing 37°C dan 28°C selama satu malam untuk *E. coli* (10^9 sel/ml) dan 24 jam untuk Xcg (10^9 sel/ml).

Konstruksi Plasmid. Konstruksi plasmid ini terdiri atas tiga bagian, yaitu: (i) penyisipan fragmen Tp^R yang diisolasi dari pAS396 (Suwanto belum dipublikasi) pada situs *Sma*I dari pNEB193 (Guan 1995) sehingga menghasilkan pNEB193-Tp^R (pYR101). Gen Tp^R ini digunakan untuk penanda antibiotika pada seleksi transforman pada *E. coli* sebelum dikonjugasikan pada Xcg, (ii) penyisipan fragmen Tp^R yang membawa situs *Pac*I dan *Pme*I dari pNEB193-Tp^R (pYR101) ke pUC18-*Not*I pada situs *Kpn*I - *Hind*III sehingga menghasilkan pUC18-*Not*I-Tp^R (pYR102), dan (iii) pemotongan pYR102 dengan *Not*I menghasilkan fragmen yang membawa Tp^R *(Pac*I-*Pme*I*)*. Fragmen ini diklon pada pUTmini-Tn*5*Km^R pada situs *Not*I sehingga menghasilkan pUTmini-Tn*5*Km^R-Tp^R (pYR103). Dasar digunakannya pUTmini-Tn*5*Km ialah bahwa hasil transposon mutagenesis pUTmini-Tn*5*Km pada Xcg memberikan frekuensi konjugasi rata-rata tertinggi dibandingkan dengan menggunakan pUTmini-Tn*5*Sp/Sm^R, pUCD623-Tn*4431*Tc, dan pEP4351-Tn*4351*Tc (Tabel 2).

Teknik Molekuler dan Mutagenesis Transposon. Plasmid diisolasi menggunakan metode lisis alkalin, ligasi transformasi *E. coli,* dan teknik molekuler lainnya dilaksanakan mengikuti metode Sambrook *et al.* (1989). Mutagenesis transposon dilakukan dengan konjugasi dua tetua (*diparental mating*) seperti yang dideskripsikan oleh Suwanto & Kaplan (1992a). *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* YR32 (resipien) ditumbuhkan pada LB + rifampisin 100 μg/ml pada suhu 28°C selama 24 jam, sedangkan *E. coli* S17-1 λ*pir* (pUTmini-Tn*5*Km^R-Tp^R atau pYR103) sebagai donor pada medium LB + kanamisin 25 g/ml + trimetoprim 100 μg/ml pada suhu 37°C selama semalam. Konjugasi dilakukan di atas kertas filter nitroselulosa pada cawan berisi agar-agar LB (pH 7.2) dan diinkubasikan pada suhu 28°C selama 12 - 24 jam. Mutan hasil konjugasi diisolasi dari suspensi bakteri setelah konjugasi pada media LA + rifampisin 100 μg/ml + kanamisin 25 μg/ml + trimetoprim 100 μg/ml yang diinkubasikan pada suhu 28°C selama 24 - 48 jam.

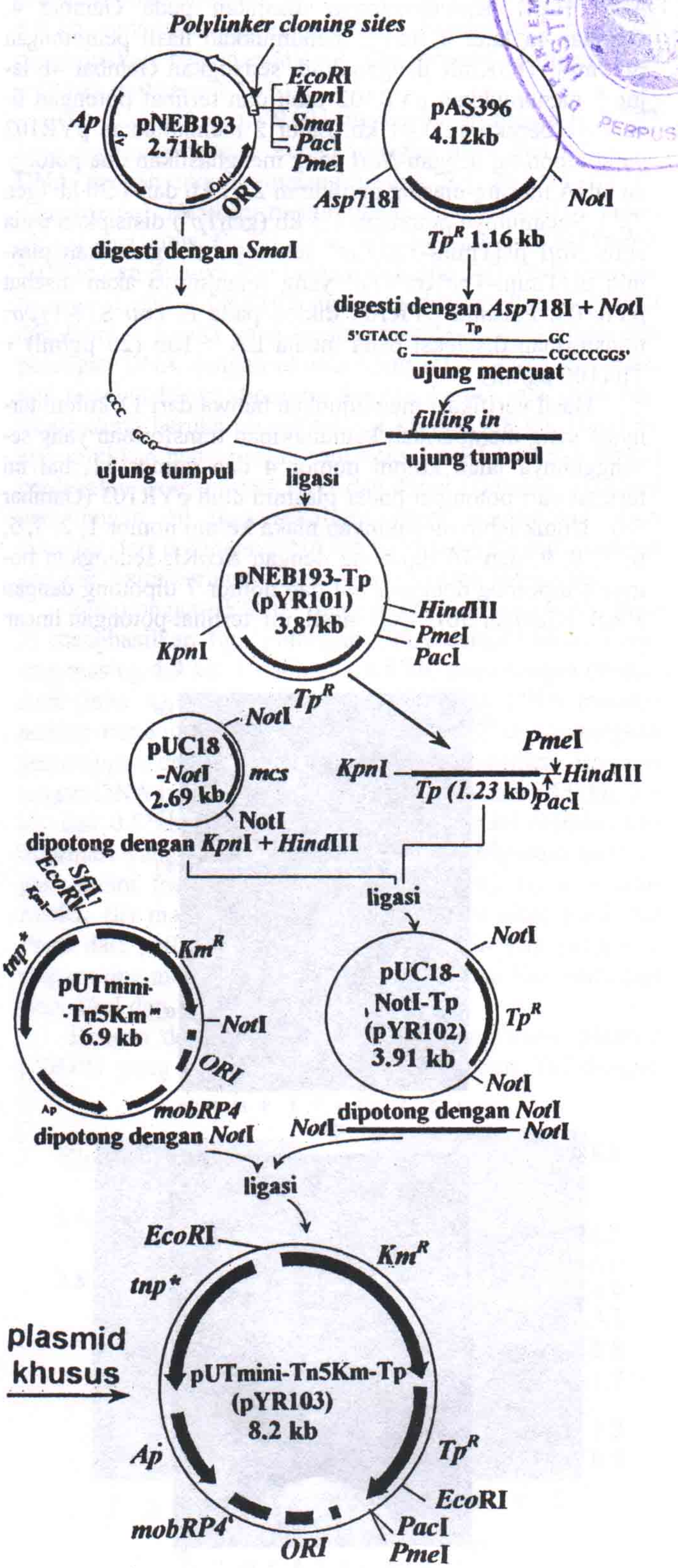
Tabel 2. Frekuensi konjugasi beberapa transposon pada *X. campestris* pv. *glycines*.

Trasnposon yang digunakan	Frekuensi (ekskonjugan/resipien)
pUD623-Tn*4431*Tc^R	1.35×10^{-9}
pEP4351-Tn*4351*Tc^R	9.23×10^{-10}
pUTmini-Tn5Km^R	6.72×10^{-6}
pUTmini-Tn5Sp/Sm^R	5.12×10^{-6}

HASIL

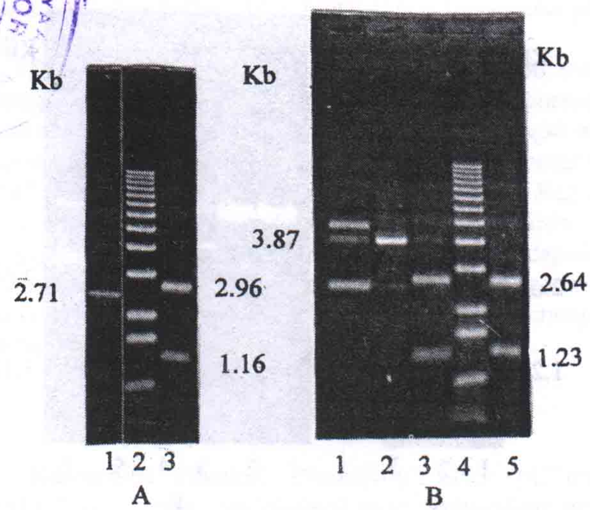
Konstruksi Plasmid. Pada penelitian ini telah berhasil dikonstruksi plasmid pYR103 berukuran 8.2 kb, plasmid ini merupakan turunan Tn*5* yang dikonstruksi dari pUTmini-Tn*5*Km^R dengan tambahan penanda antibiotika trimetoprim yang mempunyai satu situs pengenal *Pac*I dan *Pme*I (Gambar 1).

Gen Tp^R diisolasi dari pAS396 menggunakan enzim *Asp*718I (5'G↓GTACC3') dan *Not*I (5'GC↓GGCCGC3'). Fragmen DNA yang didapat mempunyai kedua ujung mencuat 5' (*5'-overhang*) sehingga memungkinkan untuk dijadikan fragmen DNA yang mempunyai ujung tumpul (*blunt end*) dengan reaksi *filling in*. Gen Tp^R ini selanjutnya disisipkan pada pNEB193 pada situs *Sma*I (*blunt end*) yang selanjutnya disebut pYR101. Plasmid pYR101 ditransformasikan pada *E. coli* DH5α dan diseleksi pada media LA yang ditambah ampisilin (100 μg/ml) dan trimetoprim (100 μg/ml). Hasil verifikasi (Gambar 2a) menunjukkan plasmid pNEB193 yang dipotong dengan *Sma*I menghasilkan satu potongan linear berukuran 2.71 kb. Pemotongan plasmid pAS396 dengan *Asp*718I + *Not*I menghasilkan dua potongan masing-masing berukuran 2.96 kb dan 1.16 kb (mengandung gen Tp^R). Gambar 2b lajur 1 merupakan pYR101 utuh (*intact*), terlihat tiga potongan yang masing-masing



Gambar 1. Konstruksi plasmid pYR103 (pUTmini-Tn5Km^R-Tp^R).

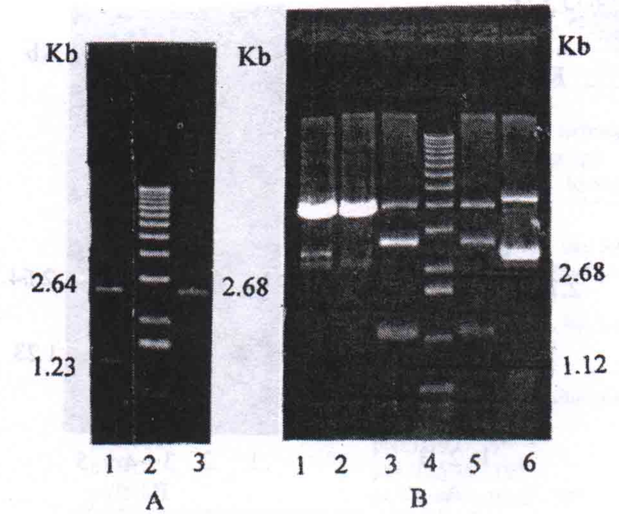
menunjukkan dari atas ke bawah bentuk *open circular* (OC), linear (3.87 kb), dan *covalently closed circular* (CCC). Lajur 2 merupakan hasil pemotongan dengan *Pac*I yang menghasilkan satu potongan linear 3.87 kb. Lajur 3



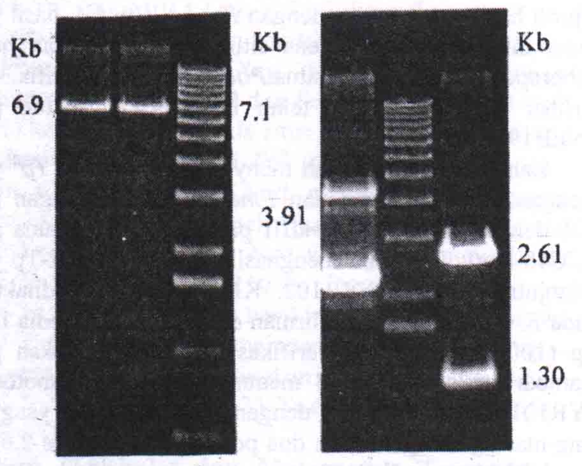
Gambar 2. Hasil verifikasi plasmid pYR101 (pNEB193-Tp^R): A. Plasmid pNEB193 dipotong dengan *Sma*I (1), 1 kb DNA Ladder (2), dan dipotong dengan *Asp*718I + *Not*I (3) B. Plasmid pYR101 (pNEB193-Tp) *intact* (utuh) (1), dipotong dengan *Pac*I (2), dipotong dengan *Kpn*I + *Pme*I (3), 1 kb DNA Ladder (4), dan dipotong dengan *Kpn*I + *Hind*III (5).

merupakan hasil pemotongan dengan *Kpn*I + *Pme*I yang menghasilkan dua potongan dengan ukuran masing-masing 2.64 kb dan 1.23 kb, hasil yang sama juga ditunjukkan pada lajur 5 hasil pemotongan dengan *Kpn*I + *Hind*III, hasil yang sama ini disebabkan karena situs *Hind*III terletak hanya beberapa nukleotida dari situs *Pac*I. Dari hasil verifikasi ini terlihat bahwa gen Tp^R telah benar-benar terklon pada pNEB193.

Langkah kedua adalah menyisipkan fragmen Tp^R yang mengandung situs *Pac*I dan *Pme*I hasil pemotongan pYR 101 dengan *Kpn*I dan *Hin*dIII pada situs yang sama pada pUC18-*Not*I. Tahap ini menghasilkan pUC18-*Not*I-Tp yang selanjutnya disebut pYR102. Kloning pYR102 dilakukan pada *E. coli* DH5α, transforman diseleksi pada media LA + Tp (100 µg/ml). Hasil verifikasi pYR102 disajikan pada Gambar 3a lajur 1 dan 3 menunjukkan hasil pemotongan pYR101 dan pUC18-*Not*I dengan *Kpn*I + *Hind*III yang masing-masing menghasilkan dua potongan berukuran 2.64 kb dan 1.23 kb (gen Tp^R) dan satu potongan 2.68 kb. Gambar 4b lajur 1 dan 2 merupakan pYR102 yang dipotong dengan *Pac*I dan *Pme*I yang masing-masing menghasilkan satu potongan linear dengan ukuran 3.91 kb, hasil ini selain menunjukkan bahwa pYR102 sudah benar menunjukkan hasil ligasi potongan 1.23 kb (gen Tp^R) dengan pUC18-*Not*I (2.68 kb) juga menunjukkan bahwa situs *Pac*I dan *Pme*I sudah benar-benar terklon, lajur 3 dan 5 adalah pYR102 yang dipotong dengan *Pac*I + *Not*I dan *Pme*I + *Not*I, yang masing-masing menghasilkan dua potongan yang berukuran 2.68 kb dan 1.12 kb, sedangkan pita lain yang berada di atas kedua pita (3.91 kb) merupakan sisa pYR102 yang tidak terpotong sempurna oleh *Pac*I + *Not*I ataupun *Pme*I + *Not*I (terjadi *partial digestion*).



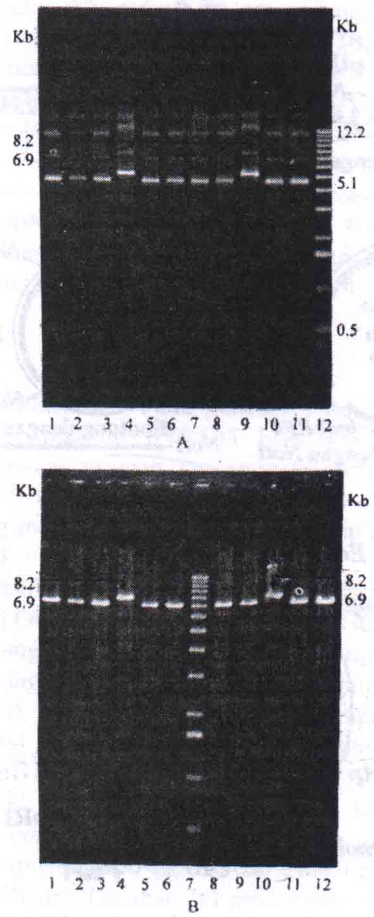
Gambar 3. Hasil verifikasi plasmid pYR102 (pUC18-*Not*I-TP[R]): A. Plasmid pYR101 yang dipotong dengan *Kpn*I + *Hind*III (1), 1 kb DNA Ladder (2), dan plasmid pUC18-*Not*I yang dipotong dengan *Kpn*I + *Hind*III (3). B. Hasil pemotongan plasmid pYR102 (pUC18-*Not*I-Tp[R]) dengan *Pac*I (1), *Pme*I (2), *Pac*I + *Not*I (3), 1 kb DNA Ladder (4), *Pme*I + *Not*I (5), dan plasmid pYR102 utuh (6).



Gambar 4. Hasil pemotongan pUTmini-Tn*5*Km[R] dan pYR102 dengan *Not*I: A. Hasil pemotongan plasmid pUTmini-Tn*5*Km dengan *Not*I (1 & 2), 1 kb DNA Ladder (3). B. plasmid pYR102 utuh (1), 1 kb DNA Ladder (2), dan hasil pemotongan pYR102 dengan *Not*I (3).

Langkah selanjutnya ialah memindah gen *Tp*[R] dari pUC18-*Not*I ke pUTmini-Tn*5*KmR. Langkah ini diawali dengan pemotongan pUTmini-Tn5Km dan pYR102 dengan *Not*I. Hasil pemotongannya disajikan pada Gambar 4. Gambar 4a lajur 1 dan 2 menunjukkan hasil pemotongan pUTmini-Tn*5*KmR dengan *Not*I, sedangkan Gambar 4b lajur 1 menunjukkan pYR102 utuh dan terlihat potongan linearnya berukuran 3.91 kb. Lajur 2 menunjukkan pYR102 yang dipotong dengan *Not*I yang menghasilkan dua potongan DNA masing-masing berukuran 2.61 kb dan 1.30 kb (gen *Tp*[R]). Selanjutnya potongan 1.3 kb (gen*Tp*[R]) disisipkan pada situs *Not*I pUTmini-Tn5Km[R] sehingga menghasilkan plasmid pUTmini-Tn*5*Km[R]-Tp[R] yang selanjutnya akan disebut pYR103. Plasmid pYR103 diklon pada *E. coli* S17-1χ*pir*, transforman diseleksi pada media LA + Km (25 µg/ml) + Tp (100 µg/ml).

Hasil verifikasi menunjukkan bahwa dari 11 koloni ternyata yang memberikan kemungkinan transforman yang sesungguhnya ialah koloni nomor 4 dan nomor 11, hal ini terlihat dari potongan linear plasmid utuh pYR103 (Gambar 5a). Untuk lebih meyakinkan maka koloni nomor 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, dan 10 dipotong dengan *Eco*RI, sedangkan nomor 4 dipotong dengan *Pac*I dan nomor 7 dipotong dengan *Pme*I (Gambar 5b). Dari hasil ini terlihat potongan linear



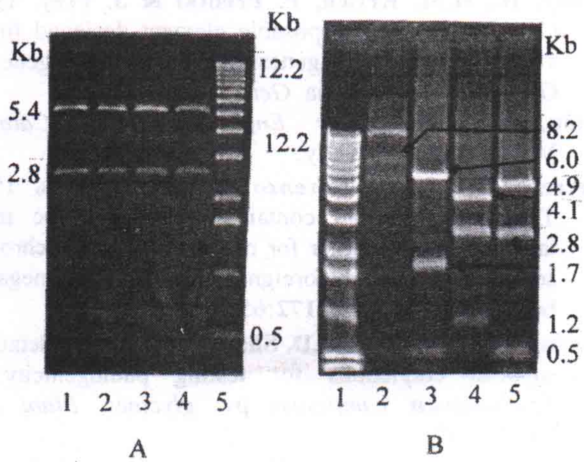
Gambar 5. Hasil verifikasi sejumlah transforman pYR103: A. Plasmid transforman utuh (1 - 11), dan 1 kb DNA Ladder (12). B. Plasmid transforman yang dipotong dengan *Eco*RI (1), (2), (3), (5), (6), (8), (9), (11), (12), *Pac*I + *Pme*I (4), (10), dan 1 kb DNA Ladder (7).

plasmid koloni nomor 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, dan 10 berukuran 6.9 kb, sedangkan nomor 4 dan 11 berukuran 8.2 kb. Ini menunjukkan bahwa nomor 4 dan nomor 11 merupakan pYR103 (6.9 kb + 1.3 kb).

Hasil verifikasi pYR103 menunjukkan bahwa pYR103 yang dipotong dengan *Eco*RI menghasilkan dua potongan DNA dengan ukuran masing-masing 5.4 kb dan 2.8 kb (Gambar 6a). Hasil ini menunjukkan bahwa pYR103 mempunyai dua situs *Eco*RI satu situs berasal dari pUTmini-Tn*5*Km dan satunya lagi berasal dari gen Tp^R. Pada Gambar 6a lajur 3 dan 4 pYR103 dipotong dengan *Pac*I + *Eco*RI dan *Pme*I + *Eco*RI yang masing-masing menghasilkan dua potongan DNA dengan ukuran yang relatif sama jika plasmid tersebut hanya dipotong dengan *Eco*RI saja yaitu masing-masing berukuran sekitar 5.4 kb dan 2.8 kb. Hasil ini menunjukkan bahwa salah satu situs *Eco*RI letaknya sangat berdekatan dengan situs *Pac*I dan *Pme*I (Gambar 2). Hasil pemotongan ini juga sekaligus dapat menentukan arah orientasi dari potongan DNA Tp^R yang ternyata sama dengan gen Km^R yaitu berlawanan arah dengan arah jarum jam.

Pemotongan pYR103 dengan *Xho*I (Gambar 6b, lajur 3) menghasilkan tiga potongan DNA dengan ukuran masing-masing 4.9 kb, 1.7 kb, dan 0.5 kb, pemotongan dengan *Ase*I (lajur 4) menghasilkan tiga potongan DNA masing-masing berukuran 4.1 kb, 2.9 kb, dan 1.2 kb. Sedangkan pemotongan dengan *Spe*I + *Eco*RI menghasilkan tiga potongan DNA juga dengan ukuran masing-masing 4.9 kb, 2.8 kb, dan 0.5 kb. Semua hasil pemotongan ini memberikan informasi yang akurat bahwa pYR103 merupakan hasil ligasi antara fragmen Tp^R yang mempunyai: (i) satu situs *Eco*RI, (ii) masing-masing membawa satu situs *Pac*I dan *Pme*I dari pNEB193, dengan pUTmini-Tn*5*Km yang masing-masing mempunyai satu situs *Eco*RI dan *Spe*I serta tiga situs *Xho*I dan *Ase*I.

Dengan demikian telah berhasil dikonstruksi plasmid pYR103 yang membawa transposon turunan Tn*5* dengan



Gambar 6. Hasil verifikasi plasmid pYR103: A. Plasmid pYR103 yang dipotong dengan *Eco*RI (1), (2), *Pac*I + *Eco*RI (3), *Pme*I + *Eco*RI (4), dan 1 kb DNA Ladder (5). B. 1 kb DNA Ladder (1). plasmid pYR103 utuh (2), plasmid pYR103 yang dipotong dengan *Xho*I (3), *Ase*I (4), *Spe*I + *Eco*RI (5).

masing-masing satu situs *Pac*I dan *Pme*I. Plasmid ini selanjutnya akan digunakan untuk mutagenesis transposon pada Xcg YR32.

Transposon Mutagenesis. Hasil transposon mutagenesis dengan menggunakan plasmid hasil konstruksi (pYR103) sebagai donor ke dalam Xcg YR32 sebagai resipien menghasilkan frekuensi konjugasi rata-rata sebesar 8.3×10^{-6} (Tabel 3). Hasil pengujian stabilitas mutan Xcg dengan lima kali replika pada media LA + kanamisin (25 µg/ml) + trimetoprim (100 µg/ml) ternyata tidak didapatkan koloni mutan Xcg yang kehilangan sifat resistensi pada kedua macam antibiotika yang digunakan. Hal ini menunjukkan bahwa mutan Xcg yang didapatkan cukup stabil.

PEMBAHASAN

Konstruksi Plasmid. Plasmid pYR103 (pUTmini-Tn*5*Km^R-Tp^R) merupakan plasmid yang mengandung transposon Tn*5* dengan tambahan penanda antibiotika trimetopim yang diambil dari pAS396. Selain itu plasmid ini juga mengandung situs pengenalan enzim restriksi *Pac*I dan *Pme*I. Plasmid ini dipakai dalam transposon mutagenesis pada Xcg untuk menghasilkan sejumlah mutan sebagai langkah awal dalam mengkonstruksi peta fisik dan genetika genom bakteri, tempat transposon mampu berpindah dari satu lokasi ke lokasi lain dalam kromosom atau dari kromosom ke plasmid dan sebaliknya (Snyder & Champness 1997). Dengan demikian transposon Tn*5* yang ada pada plasmid ini akan sangat berguna dalam melokalisir gen-gen yang ada pada genom bakteri tersebut.

Gen Tp^R yang dipakai dalam konstruksi plasmid ini memang seolah-olah menjadi tidak berfungsi dalam transposon mutagenesis pada Xcg karena secara alami bakteri tersebut telah resisten terhadap trimetoprim, tetapi untuk seleksi mutan Xcg tidak menjadi masalah karena pada pYR103 ada gen Km^R tempat Xcg peka terhadap kanamisin. Gen Tp^R digunakan untuk memudahkan seleksi kloning konstruksi plasmid pYR101 dan pYR102 (Gambar 1). Selain itu gen Tp^R ini mengandung 95 situs pengenalan enzim restriksi, tetapi tidak mengandung situs pengenalan *Ase*I (Swift *et al.* 1981). Situs pengenalan *Ase*I sangat berguna untuk lokalisasi genetika secara parsial pada genom Xcg dan genom Xcg dapat dipotong dengan *Ase*I menghasilkan 47 potongan DNA (Widjaja 1996).

Telah dikemukakan pada pendahuluan bahwa untuk memperhalus dan melengkapi peta fisik dan genetika genom Xcg diperlukan tambahan situs pemotongan *Pac*I dan *Pme*I. Kedua situs pemotongan ini pada Xcg merupakan enzim yang memotong jarang yang masing-masing memotong genom bakteri tersebut menjadi 3 dan 5 potongan DNA. Situs

Tabel 3. Frekuensi konjugasi pYR103 pada *X. campestris* pv. *glycines* YR32.

Eksperimen Ke	Frekuensi (ekskonjugan/resipien)
1	6.7×10^{-6}
2	8.2×10^{-6}
3	1.0×10^{-5}
Rataan	8.3×10^{-6}

*Pac*I dan *Pme*I pada konstruksi plasmid ini diambil dari *polylinker cloning sites* plasmid pNEB193 (Guan 1995). Dari hasil transposon mutagenesis Xcg dengan plasmid pYR103 telah didapatkan sejumlah mutan Xcg yang pada genomnya diharapkan mendapat tambahan masing-masing satu situs *Pac*I dan *Pme*I. Hasil penelitian ini memberikan implikasi suatu model pendekatan pemetaan fisik dan lokalisasi gen pada genom suatu organisme dengan cara mendapatkan mutan-mutan dan lokasi gen tersebut dapat ditentukan dengan hibridisasi Southern menggunakan transposon yang bersangkutan sebagai pelacaknya (*probe*). Selain itu plasmid hasil konstruksi ini kemungkinan dapat digunakan pada *X. campestris* patovar lain bukan hanya patovar *glycines* bahkan mungkin dapat digunakan untuk spesies *Xanthomonas* lain.

Mutagenesis Transposon. Berbagai transposon dengan penanda antibiotika telah diisolasi dari alam, tetapi sejauh ini transposon yang paling banyak dipakai untuk percobaan mutagenesis pada bakteri Gram-negatif non *E. coli* ialah Tn*5*. Hal ini disebabkan karena selain Tn*5* dapat digunakan pada kebanyakan bakteri Gram-negatif juga menyisip secara acak dan mutasi yang diakibatkannya pada umumnya karena penyisipan oleh transposon itu sendiri (Simon 1984).

Hasil konjugasi dua tetua antara *E. coli* S17-1λ*pir* (pYR103) sebagai donor dengan resipien Xcg YR32 Rif^R-Tp^R menghasilkan Xcg YR32 Rif^R-Tp^R yang resisten terhadap kanamisin. *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* YR32 telah resisten secara alami terhadap trimetoprim (Mesak *et al.* 1994, Widjaja 1996). Meskipun demikian pYR103 tetap masih dapat digunakan karena adanya Km^R pada plasmid tersebut, sedangkan Xcg YR32 rentan terhadap kanamisin. Adapun frekuensi rata-rata transkonjugan yang dihasilkan sebesar 8.3×10^{-6} per resipien. Turner *et al.* (1984) melaporkan bahwa frekuensi konjugasi dua tetua dari *E. coli* ke *X. campestris* pv. *campestris* berkisar antara 6×10^{-5} sampai dengan 5×10^{-3} per resipien. Hasil yang didapatkan ternyata sedikit lebih rendah jika dibandingkan dengan hasil yang didapatkan oleh Turner *et al.* (1984) karena resipien yang digunakan mungkin berbeda patovarnya. Mesak *et al.* (1994) melaporkan hasil mutagenesis transposon Xcg 8ra dengan pJFF350 yang mengandung transposon Omegon-Km menghasilkan transkonjugan rata-rata sekitar 6.4×10^{-6} per resipien, jadi hasil yang didapatkan dalam penelitian ini sesuai dengan hasil yang didapatkan Mesak *et al.* (1994) meskipun berbeda donor. Hasil ini relatif lebih tinggi daripada yang dilaporkan Widjaja (1996) dan Rosana (1997) yang menghasilkan transkonjugan rata-rata masing-masing 5.8×10^{-8} dan 1.9×10^{-7} per resipien. Dengan demikian pYR103 dengan hasil frekuensi transkonjugan relatif lebih tinggi dibandingkan hasil sebelumnya sehingga dapat digunakan untuk mutagenesis transposon pada Xcg YR32.

Transposon Omegon-Km, maupun Tn*5* dan turunannya telah dilaporkan memiliki situs penyisipan yang acak di dalam genom (Berg *et al.* 1984, Fellay *et al.* 1989, Suwanto & Kaplan 1992b). Selain itu gen penyandi transposasenya berada di luar segmen DNA transposon Omegon-Km, KTS, mini-Tn*5*Sp/Sm, dan mini-Tn*5*Km sehingga setelah terjadi transposisi elemen tersebut tidak mampu melakukan retransposisi atau meloncat lagi (Berg *et al.* 1984, Herrero *et al.* 1990, de Lorenzo *et al.* 1990, Suwanto & Kaplan 1992). Mutan yang dihasilkan dengan transposon semacam ini biasanya sangat stabil (tidak mudah mengalami reversi). Dengan demikian berdasarkan hasil dan keterangan di atas maka pYR103 (pUTmini-Tn*5*Km^R-Tp^R) sebagai turunan dari Tn5 dapat digunakan untuk mutagenesis transposon pada Xcg YR32. Dengan hasil frekuensi konjugasi yang relatif lebih tinggi diharapkan akan didapatkan variasi genetika mutan yang tinggi yang sangat berguna dalam pemetaan fisik dan genetika genom Xcg YR32.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek URGE *Batch II/Second Year* 1997/1998. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Steven E. Lindow, *Department Plant and Microbial Biology, University of California at Berkeley* atas kesempatan *Overseas Internship for Graduate Student* untuk mempelajari Transposon Mutagenesis pada *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*.

DAFTAR PUSTAKA

Berg, D.E., C. M. Berg & C. Sasakawa. 1984. The bacterial transposon Tn*5*: evolutionary inferences. *Mol. Biol. Evol.* **1**:411-422.

de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik & K.N. Timmis. 1990. Mini-Tn*5* transposon derivates for insertion mutagenesis, promotor probing and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6568-6572.

Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin & D.R. Helinski. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram negatif bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **77**:7347-7351.

Fellay, R., H.M. Krisch, P. Prentki & J. Frey. 1989. Omegon-Km: a transposable element designed for in vivo insertional mutagenesis and cloning of genes in Gram-negative bacteria. *Gene* **76**:215-226.

Guan, C. 1995. *New England Biolabs Catalog.* Massachusetts: Beverly.

Herrero, M., V. de Lorenzo & K.N. Timmis. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection marker for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6557-6567.

Hwang, I., S.M. Lim & P.D. Shaw. 1992. Use of detached soybean cotyledons for testing pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. *Plant Dis.* **76**:182-183.

Mesak, F. M., A. Suwanto, B. Tjahjono & E. Guhardja. 1994. Modifikasi bioesei kotiledon kedelai untuk uji patogenesis *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. *J. Il. Pert. Indon.* **4**:77-82.

Rosana, L. 1997. Konstruksi dan karakterisasi mutan protease *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra hasil mutagenesis transposon. Tesis. Bogor: Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.

Rostas, K., S. Sista, J. Stanley & O.P.S. Verma. 1984. Transposon mutagenesis of *Rhizobium japonicum*. *Mol. Gen. Genet.* **197**:230-235.

Rukayadi, Y. 1995. Analisis profil DNA genom sejumlah isolat *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* menggunakan elektroforesis gel medan berpulsa (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Tesis. Bogor: Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.

Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor.

Sharma, A., A.N. Syed & P.M. Nair. 1994. Characterization and plasmid profile of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* from Maharashtra, India. *J. Phythopathol.* (Berlin) **141**:53-58.

Shaw, J.J., L.G. Settler & C.I. Kado. 1988. Transposon Tn*4431* mutagenesis of *Xanthomonas campestris pv. campestris*: characterization of a non pathogenetic mutant and cloning of a locus for pathogenicity. *Mol. Plant. Microb. Interact.* **1**:39-45.

Shoemaker, N.B., C. Getty, F.F. Gardner & A.A. Salyers. 1986. Tn*4351* transposes in *Bacteriodes* spp. and mediates the integration of plasmid R751 into the *Bacteriodes* chromosome. *J. Bacteriol.* **165**:929-936.

Simon, R. 1984. In vivo genetic engineering: use of transposable elements in plasmid manipulation and mutagenesis of bacteria other than *E. coli*, hlm. 125-140. *Di dalam* A. Puhler & K.N. Timmis (ed.), *Advanced Molecular Genetics*. New York: Springer-Verlag.

Simon, R., U. Priefer & A. Puhler. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology* **1**:784-791.

Snyder, L. & W. Champness. 1997. *Molecular Genetics of Bacteria*. Ed. Pertama. Washington: ASM Press.

Suwanto, A. & S. Kaplan. 1992a. A self-transmissable narrow-host range endogenous plasmid of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 physical structure, incompatibility determinants, origin of replication, and transfer function. *J. Bacteriol.* **174**:1124-1134.

Suwanto, A. & S. Kaplan. 1992b. Chromosom transfer in *Rhodobacter sphaeroides*: Hfr formation and genetic evidence for two unique circular chromosomes. *J. Bacteriol.* **174**:1135-1145.

Swift, G., B.J. McCarthy & F. Heffron. 1981. DNA squence of a plasmid-encoded dihydrofolate reductase. *Mol. Gen. Genet.* **181**:441-447.

Turner, P., C.E. Barber & M.J. Daniels. 1985. Evidence of clustered pathogenicity genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol. Gen. Genet.* **199**: 338-343.

Widjaya, R. 1996. Pemetaan fisik dan genetik kromosom *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* YR32. Tesis. Bogor: Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.