

# Kloning DNA Genom Pengapit Transposon dari Mutan Nonpatogenik *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* M715

## *Cloning of Genomic DNA Flanking Transposon in the Nonpathogenic Mutant of Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* M715

ALINA AKHDIYA RUSMANA<sup>1\*</sup>, ANTONIUS SUWANTO<sup>1\*</sup>, BUDI TJAHJONO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

<sup>2</sup>Departemen Hama dan Penyakit Tanaman, Faperta, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

Diterima 15 Desember 2003/Disetujui 20 Mei 2005

The objective of this work is to clone flanking DNA derived from Tn-5 mutagenesis of wild type strain *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* as first step to clone and to identify the gene involved in pathogenicity mechanism. We have localized the flanking DNA fragment from a nonpathogenic mutant of *Xag* M715. Southern hybridization analysis using 2.8 kb *EcoRI* from pYR103 as a probe showed that the fragment is located within 2.0 kb *PstI* fragment. A 0.7 kb flanking DNA was amplified using inverse PCR technique, and inserted into pGEM-T Easy vector generating a 3.7 kb recombinant plasmid (pAA01). Southern hybridization analysis of the wild type (YR32) with pAA01 as a probe indicated a hybridization signal located at approximately 3.0 kb *PstI* fragment. DNA sequence analysis revealed that the DNA fragment has a 64% identity to a *vir* gene of *Bacillus anthracis*.

### PENDAHULUAN

*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*) atau yang sebelumnya lebih dikenal sebagai *X. campestris* pv. *glycines* merupakan bakteri penyebab penyakit bisul pada tanaman kedelai (Moffet & Croft 1983). Penyakit ini diperkirakan terdapat di seluruh wilayah penanaman kedelai di dunia terutama yang beriklim hangat dan lembab (Kennedy & Sinclair 1989), termasuk pada area penanaman kedelai di Indonesia (Machmud *et al.* 1999). Pada musim hujan penyakit ini menyebar dengan cepat (Graham 1953), dan bakteri penyebabnya dapat bertahan hidup pada biji kedelai sampai 2.5 tahun (Patel & Jindal 1972).

Gejala penyakit bisul bakteri pada kedelai umumnya terlihat pada daun, tetapi kadang-kadang gejala yang mirip juga muncul pada polong. Daun yang terinfeksi berat akan menguning dan gugur. Bahkan pada tanaman yang rentan, infeksi yang berat dapat mengakibatkan defoliasi total (Dunleavy *et al.* 1966). Pada akhirnya, infeksi akan menyebabkan penurunan ukuran dan jumlah polong yang dihasilkan. Hasil penelitian Shukla (1994) menunjukkan bahwa pada tingkat infeksi lebih dari 75%, penurunan produksi kedelai dapat mencapai 53%, oleh karena itu penyakit ini sangat merugikan.

Adanya tekanan terhadap upaya pengendalian penyakit tanaman yang bersifat ramah lingkungan menuntut

pemahaman yang baik tentang mekanisme patogenitas penyakit serta faktor-faktor ekologi yang berperan dalam mendorong maupun menekan timbulnya penyakit.

Kemampuan bakteri menimbulkan penyakit pada tanaman inangnya bergantung pada banyak aspek diantaranya aspek lingkungan, perkembangan, dan fisiologi inang, perkembangan dan fisiologi patogen serta ekspresi dari faktor patogenitas yang memerlukan koordinasi dari sejumlah besar fungsi pada bakteri (Sigeo 1993; Fenselau *et al.* 1992).

Dari serangkaian penelitian tentang *Xag* telah dihasilkan antara lain peta makrorestriksi genom *Xag* YR32 (Widjaya *et al.* 1999) serta sejumlah transposon mutan dari bakteri tersebut. Salah satu dari mutan-mutan yang diperoleh adalah *Xag* M715 (Rukayadi *et al.* 2000). Mutan tersebut menarik untuk diteliti lebih lanjut sebagai bahan untuk menelaah mekanisme patogenitas pada taraf molekuler, karena berdasarkan hasil uji bioassay pada kotiledon dan tanaman kedelai tidak menunjukkan gejala bisul maupun klorosis. Di samping itu, mutan ini juga tidak menimbulkan reaksi hipersensitivitas pada daun tomat M715 (Rukayadi *et al.* 2000).

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengklon dan merunut DNA genom pengapit transposon pada *Xag* M715 sebagai tahap awal untuk mengidentifikasi gen yang terlibat dalam mekanisme patogenitas *Xag*. Dari penelitian ini diharapkan dapat diperoleh suatu hasil yang akan memberikan manfaat dalam upaya mengungkap mekanisme patogenitas *X. axonopodis* pv. *glycines*. Tidak menutup kemungkinan pada suatu saat nanti, dari hasil-hasil penelitian yang ada dapat dikembangkan teknik-teknik pengendalian baru seperti teknik deteksi penyakit secara dini dan cepat, serta pengembangan vaksin tanaman.

\*Alamat kini: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jalan Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111

\*Penulis untuk korespondensi, Tel./Fax. +62-251-345011,  
E-mail: asuwanto@indo.net.id

## BAHAN DAN METODE

**Galur Bakteri, Plasmid, dan Media.** Galur-galur bakteri yang digunakan dalam penelitian ini ialah *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen), *X. axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*) YR32 (Rukayadi 1995), dan *Xag* M715 yang merupakan hasil mutasi transposisi dari *Xag* YR32 dengan menggunakan turunan dari Tn5 (Rukayadi *et al.* 2000). Plasmid yang digunakan ialah pYR103 (Rukayadi 1998), pAA01 (penelitian ini), pGEM-T Easy (Promega), dan pUC19 (Sambrook *et al.* 1989). *Xag* dikulturkan pada media agar-agar ekstrak khamir pH 7.2 (dekstrosa 5 g/l, ekstrak khamir 10 g/l, kalsium karbonat 20 g/l, agar-agar 15 g/l, dan antibiotik yang sesuai) atau kaldu Luria Bertani (LB) pH 7.2 (tripton 1 g/l, ekstrak khamir 0.5 g/l, dan NaCl 1 g/l) pada suhu 28 °C. Sedangkan *E. coli* dikulturkan di media LB atau agar-agar LB (LB ditambah 1.5% agar-agar dan antibiotik yang sesuai) pada suhu 37 °C.

**Isolasi DNA.** DNA kromosom *Xag* diisolasi menggunakan metode Leach *et al.* (1994) yang dimodifikasi sebagaimana dipaparkan Rusmana (2000), sedangkan isolasi DNA plasmid dilakukan dengan menggunakan kit Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison Wisconsin). Isolasi dan pemurnian fragmen DNA dari gel agarosa dilakukan dengan menggunakan Kit GFX<sup>™</sup> PCR (Amersham Pharmacia Biotech).

**Analisis Hibridisasi Southern.** Fragmen-fragmen DNA ditransfer ke membran nilon (Zeta-Probe<sup>®</sup>GT Genomic, BIO-RAD) dengan metode kapiler (Sambrook *et al.* 1989). 2.8 kb fragmen DNA dari pYR 103 yang dipotong dengan *Eco*RI digunakan sebagai pelacak (probe). Pelacak dilabel dengan menggunakan Kit NEBlot<sup>™</sup> Phototope<sup>™</sup> (New England Biolab), sedangkan deteksi dilakukan menggunakan kit Phototope<sup>™</sup>-Star Detection (New England Biolabs). Film X-ray yang digunakan ialah High Performance Autoradiography Film (Hyperfilm<sup>™</sup> MP, Amersham Life-Science).

**Kloning DNA Genom Pengapit Transposon.** Fragmen DNA genom *Xag* M715 (*Pst*I) berukuran 2.0 kb yang membawa penanda transposon dan DNA pengapitnya diligasikan dengan vektor pUC19 kemudian ditransformasikan ke *E. coli* TOP10. Selanjutnya DNA pengapit yang terdapat pada plasmid rekombinan tersebut diamplifikasi secara *in vitro* pada mesin PCR GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, New Jersey) dengan kit PCR, Ready-To-Go, PCR Beads (Pharmacia, Biotech) menggunakan primer spesifik Kanamisin (5'-GAATATGGCTCATAACAC-3') (GENSET, Singapore Biotech. Pte Ltd, Singapore) yang didesain berdasarkan runutan *Km*-Tn903 (Oka *et al.* 1981), dan M13f (5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3') (GENSET, Singapore Biotech. Pte Ltd, Singapore). PCR dilakukan dengan kondisi sebagaimana dipaparkan Rusmana (2000). Amplikon dari DNA pengapit yang diperoleh diligasikan dengan vektor pGEM-T Easy membentuk plasmid rekombinan pAA01, selanjutnya ditransformasikan ke *E. coli* TOP10.

**Transformasi.** Transformasi DNA dan penyiapan sel kompeten dengan teknik CaCl<sub>2</sub> dingin dilakukan menurut metode Sambrook *et al.* (1989).

**Perunutan DNA.** Perunutan DNA dilakukan dengan piranti Automated DNA sequencer ABI PRISM 377 (Perkin Elmer, New Jersey). Cycle sequencing DNA cetakan dilakukan dengan menggunakan kit BigDye<sup>®</sup> Ready Reaction Mix (Perkin Elmer Biosystem, Branchburg, New Jersey). Runutan DNA yang diperoleh dibandingkan dengan basis data runutan DNA pada European Bioinformatics Institute (EBI) Fasta 3.

## HASIL

**Kloning DNA Genom Pengapit Transposon.** *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*) M715 merupakan hasil mutasi transposisi terhadap *Xag* YR32 dengan menggunakan turunan Tn5 (pUTmini-Tn5Km<sup>R</sup>-Tp<sup>R</sup>) (Rukayadi *et al.* 2000). Analisis hibridisasi Southern genom *Xag* M715 yang dipotong dengan *Pst*I menggunakan fragmen *Eco*RI 2.8 kb dari pYR103 sebagai pelacak, menunjukkan adanya satu sinyal pada pita DNA berukuran ± 2.0 kb (Gambar 1). Amplifikasi DNA pengapit dengan primer spesifik Km-Tn903 dan primer universal M13-Forward diperoleh amplikon berukuran ± 0.7 kb. Ligasi amplikon dengan plasmid vektor (pGEM-T Easy) menghasilkan plasmid rekombinan (pAA01) berukuran ± 3.7 kb (Gambar 2 & 3). Plasmid rekombinan ini selanjutnya ditransformasikan ke *E. coli* TOP 10.

**Identifikasi DNA Genom Pengapit Transposon.** Salah satu cara untuk mengidentifikasi suatu gen adalah dengan melakukan perunutan DNA-nya. Identitas suatu gen yang telah diketahui runutan DNA-nya dapat ditentukan dengan membandingkan runutan DNA tersebut dengan data runutan DNA yang sudah ada pada GenBank. Pada penelitian ini, analisis data hasil perunutan DNA produk PCR melalui Web European Bioinformatics Institute (EBI) fasta 3, menunjukkan kemiripannya dengan gen *vir* dari *Bacillus anthracis* dengan nilai 64% dari 75 nukleotida yang overlap (Gambar 4).

## PEMBAHASAN

Hibridisasi yang terjadi antara fragmen berukuran 2.0 kb pada genom *Xag* M715 yang dipotong dengan *Pst*I dengan fragmen 2.8 kb dari pYR103 yang dipotong dengan *Eco*RI (Gambar 1), menunjukkan bahwa pada fragmen 2.0 kb tersebut terdapat transposon yang menyisip. Mengingat adanya satu situs *Pst*I di antara gen *Km*<sup>R</sup> dan *Tp*<sup>R</sup> pada pYR103 (Gambar 5), maka diduga pada pita tersebut terdapat dua fragmen DNA berukuran hampir sama yang masing-masing membawa kedua sisi transposon dan DNA pengapitnya. Kedua sisi pengapit transposon ini diduga merupakan bagian gen yang terlibat dalam mekanisme patogenisitas *Xag* karena penyisipan transposon tersebut menyebabkan hilangnya sifat patogenisitas bakteri ini.

Kloning DNA pengapit dilakukan melalui metode PCR, yaitu DNA yang diklon merupakan replika atau produk amplifikasi *in vitro* (PCR) dari DNA pengapit. Amplifikasi dilakukan menggunakan primer spesifik Km-Tn903 dan primer universal M13-Forward, oleh karena itu amplikon yang diperoleh dan diklon merupakan hasil amplifikasi dari salah satu sisi DNA pengapit saja. Hasil amplifikasi kemudian



protein Hrp sebagai suatu perangkat sekresi (Fenselau *et al.* 1992). Hal ini mengindikasikan adanya konservasi fungsional sistem sekresi tipe III di antara bakteri patogen tumbuhan dan patogen mamalia (Lindgren 1997; Rossier *et al.* 1999; Chan & Goodwin 1999). Gen-gen *hrp* memainkan peranan penting dalam interaksi bakteri fitopatogen dengan tumbuhan inangnya. Kelompok gen-gen *hrp* berperan dalam patogenisitas dan reaksi hipersensitivitas, sehingga mutasi pada gen-gen tersebut dapat mengakibatkan hilangnya kemampuan patogenisitas pada inang serta menyebabkan hilangnya reaksi hipersensitivitas (Chan & Goodwin 1999).

Rukayadi *et al.* (2000) melaporkan bahwa dari hasil uji patogenisitas bioasai kotiledon dan uji pada tanaman kedelai, *Xag* M715 memberikan hasil negatif. Mutan ini juga tidak menimbulkan reaksi hipersensitivitas pada daun tomat. Hasil percobaan tersebut menunjukkan bahwa mutasi yang terjadi telah mengakibatkan *Xag* M715 tidak dikenali lagi oleh tumbuhan inang yang semula *compatible* dengan tanaman kedelai maupun yang *incompatible* dengan tanaman tomat. Mengacu pada model yang dihipotesiskan oleh Fenselau *et al.* (1992), perubahan respon tanaman inang ini mengindikasikan adanya kegagalan proses *cell signaling* oleh *Xag* M715.

Dalam model hipotetik *cell signaling* antara *X. campestris* pv. *vesicatoria* dengan tumbuhan *pepper*, Fenselau *et al.* (1992) mengemukakan bahwa gen-gen *hrp* diregulasi oleh faktor-faktor asal tumbuhan yang sampai saat ini belum diketahui. HrpA1, HrpB3, HrpC2, dan mungkin beberapa protein Hrp yang lain, membentuk suatu kompleks berupa saluran atau pori yang dapat mengekskpor molekul-molekul faktor virulen ataupun avirulen (*elicitor*). *Elicitor-elicitor* ini selanjutnya dikenali oleh reseptor pada tumbuhan. Pada akhirnya interaksi *elicitor-reseptor* ini akan mengakibatkan timbulnya respon hipersensitivitas atau penyakit (pada inang yang sesuai).

Kegagalan *Xag* M715 dalam proses *cell signaling* ini diduga telah menyebabkan mutan ini tidak mampu melepaskan *elicitor-elicitor*, sehingga keberadaannya menjadi tidak dikenali lagi oleh inang. Kondisi ini menyebabkan bakteri ini dapat bertahan hidup dengan cukup baik pada tanaman kedelai tanpa menimbulkan gejala penyakit. Gagalnya pelepasan *elicitor-elicitor* tersebut diantaranya dapat terjadi akibat tidak berfungsinya salah satu gen *hrp* yang menyandikan protein perangkat ekskresi *elicitor*, gen regulator gen-gen *elicitor*, atau gen penyandi *elicitor* itu sendiri sebagai akibat penyisipan transposon.

Runutan DNA yang diperoleh pada penelitian ini merupakan hasil analisis terhadap runutan DNA salah satu sisi DNA pengapit, sehingga hasilnya bisa berbeda bila analisis dilakukan kembali terhadap gabungan runutan kedua sisi DNA pengapit. Oleh karena itu hasil analisis runutan DNA ini belum dapat digunakan untuk menentukan secara tepat jenis gen yang tersisipi transposon. Karenanya diperlukan penelitian lebih lanjut untuk melengkapi data runutan DNA yang telah ada sehingga informasi yang diperoleh menjadi lebih berarti.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Riset Unggulan Terpadu VII kepada BT dan AS.

## DAFTAR PUSTAKA

- Chan JWYF, Goodwin PH. 1999. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. *Biotech Adv* 17:489-508.
- Dunleavy JM, Chamberlain DW, Ross JP. 1966. *Soybean Diseases*. Washington: Agricultural Handbook.
- Fenselau S, Balbo I, Bonas U. 1992. Determination of pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are related to proteins involved in secretion in bacterial pathogen animals. *Mol Plant Microb Interact* 5:390-396.
- Graham JH. 1953. Overwintering of three bacterial pathogens of soybean. *Phytopathology* 43:189-192.
- Kennedy BW, Sinclair JB. 1989. Bacterial pustule. Di dalam: Sinclair JB, Beckman PA (ed). *Compendium of Soybean Diseases*. Minnesota: APS Pr.
- Leach JE, White FF, Rhoads ML, Leung H. 1994. A repetitive DNA sequence differentiates *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* from other pathovar of *Xanthomonas campestris*. *Mol Plant Microb Interact* 3:238-248.
- Lindgren PB. 1997. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annu Rev Phytopathol* 35:129-152.
- Machmud M, Jumanto H, Sujadi M. 1999. Current progress of research on soybean diseases in Indonesia. Di dalam: *Proceedings of Workshop on Soybean Biotechnology for Aluminium Tolerance on Acid Soils and Diseases Resistance*. Bogor, 14-15 Sep 1999. hlm 82-91.
- Moffet MJ, Croft BJ. 1983. *Xanthomonas*. Di dalam: Fahy PC, Persley GL (ed). *Plant Bacterial Diseases: A Diagnostic Guide*. Sidney: Academic Pr. hlm 189-229.
- Oka A, Sugisaki H, Takanami M. 1981. Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn 903. *Mol Biol* 147:217-226.
- Patel PN, Jindal JK. 1972. Bacterial pustule of soybean. Di dalam: Patel PN (ed). *Plant Bacteriology*. Vol I. Bacterial Diseases of Plants in India. New Delhi: Indian Agricultural Research Institute. hlm 59-65.
- Rossier O, Wengelnik K, Hahn K, Bonas U. 1999. The *Xanthomonas* Hrp III types system secretes proteins from plant and mammalian bacteria pathogens. *Proc Natl Acad Sci* 99:9368-9373.
- Rukayadi Y. 1995. Analisis profil DNA genom sejumlah isolat *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* dengan menggunakan elektroforesis gel medan berpulsa [Tesis]. Bogor: Program Studi Biologi, Institut pertanian Bogor.
- Rukayadi Y, Suwanto A, Tjahjono B. 1998. Konstruksi plasmid yang mengandung situs *PacI* dan *PmeI* untuk transposon mutagenesis pada *Xanthomonas campestris*. *Hayati* 5:79-85.
- Rukayadi Y, Suwanto A, Tjahjono B, Harling R. 2000. Survival and epiphytic fitness of a nonpathogenic mutant of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. *Appl Environ Microbiol* 66:1183-1189.
- Rusmana AA. 2000. Kloning gen yang terlibat dalam mekanisme patogenisitas *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* [Tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut pertanian Bogor.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning*. Book 1. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pr.
- Shukla AK. 1994. Pilot estimation studies of soybean (*Glycine max*) yield losses by various levels of bacterial pustule (*Xanthomonas campestris* pv. *glycines*) infection. *Int J Pest Manag* 40:249-251.
- Sigee. 1993. *Bacterial Plant Pathology: Cell and Molecular Aspects*. Melbourne: Cambridge University Pr.
- Widjaya R, Suwanto A, Tjahjono B. 1999. Genome size and macrorestriction map of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* YR32 chromosome. *FEMS Microbiol Lett* 175:59-68.