

## 길항물질 2,4-diacetylphloroglucinol 생합성관련 유전자의 *Pseudomonas* spp. 염색체에 도입 및 형질전환균주의 특성

김 달 수

LG화학 기술연구원  
대전광역시 유성구 문지동 104-1

The 2,4-diacetylphloroglucinol (Phl) biosynthesis locus, originally cloned from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87, was introduced into the chromosome of seven fluorescent *Pseudomonas* strains (natural Phl producers: Q2-87R, Q65c-80R; Phl nonproducers: 2-79RN<sub>10</sub>, 30-84R, M4-80R, Q69c-80R and Q29z-80R) each with natural biocontrol activity against take-all of wheat or Pythium damping-off of chickpea. These transgenic pseudomonads were constructed by conjugating recipient pseudomonads with *Escherichia coli* S17-1( $\lambda$ pir)(pUT::Km::phl) harboring a plasmid containing the Phl locus cloned within the minitransposon Tn5. Southern blot analysis revealed that the Phl locus was inserted randomly and uniquely into the recipient chromosome. HPLC analysis revealed that most transgenic pseudomonads were able to produce Phl, and their capability of Phl production varied. Transgenic isolates of both Q2-87R and Q65c-80R produced more Phl than their respective parental strains. Transgenic isolates of 2-79RN<sub>10</sub>, a natural producer of phenazine-1-carboxylic acid (PCA), produced both PCA and Phl, whereas those of 30-84R, another phenazines producer, produced Phl but not phenazines any longer. The transgenic isolates of the Phl nonproducers M4-80R, Q29z-80R and Q69c-80R began to produce Phl after introduction of the Phl locus. Most transgenic pseudomonads exhibited consistent colony morphology and viability. However, the transgenic isolates of Q69c-80R, a biocontrol strain without any apparent antibiotic production, were not stable in those traits. They generally produced smaller and extraordinary colonies compared to the parent strain, indicating a high Phl production. When tested for the biocontrol activity with the transgenic isolates of Q69c-80R, they did not significantly improve the activity against take-all but required much smaller populations to obtain the significant suppression compared to the nontreated control.

## 서 론

식물생육촉진근권세균(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)은 식물의 근권(rhizosphere)

에 정착하여 살고 있는 세균으로 종자나 뿌리에 처리하였을 때 식물의 생장을 증진시킨다 (Kloepper 등, 1980). PGPR은 주로 토양중의 병원균에 직접 또는 간접적으로 영향을 미쳐 식물의 생육촉진효과를 가져오는 것으로 알려져 있다(Schroth 등, 1982; Suslow 등, 1982). 근권미생물에 의한 길항물질의 생성은 근권에서 병발생을 억제하는데 가장 크게 기여하고 있다(Thomashow 등, 1995). 형광성 *Pseudomonas* 세균은 2차대사산물(secondary metabolite)로 분비하는 길항물질인 2,4-diacetylphloroglucinol (Phl), phenazine-1-carboxylic acid (PCA), pyrrolnitrin 및 pyoluteorin 등을 이용하여 토양병의 발생을 억제시킨다(Thomashow 등, 1995).

이 가운데 Phl을 생성하는 *Pseudomonas*는 다른 길항물질을 분비하는 세균과는 달리 전세계적으로 가장 넓게 분포되어 있고 여러가지 토양병의 발생을 억제하는 것으로 알려져 있다. 예를들면, *P. fluorescens* CHA0은 담배뿌리썩음병 (*Thielaviopsis basicola*) (Keel 등, 1990, 1992)과 밀뿌리썩음병(*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) (Keel 등, 1992), *P. fluorescens* Q2-87은 밀뿌리썩음병(Vincent 등, 1991), 그리고 *P. fluorescens* F113은 사탕수수모잘록병 (*Pythium ultimum*) (Fenton 등, 1992; Shanahan 등, 1993)의 발생을 억제하는데 Phl이 큰 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

미생물을 이용한 토양병의 생물학적 방제를 실용화하는데 있어 가장 어려운 점은 미생물이 환경적인 요인에 영향을 받아 병발생의 억제효과가 장소와 시기에 따라 일정하지 않다는 것이다. 일정하고 효과적인 방제효과를 얻기 위해서는 병발생을 억제하는 기작의 지속적인 발현이 요구된다. 길항물질의 생성이 병발생의 억제에 중요한 기작인 세균의 경우 근권에 정착하는 능력이 뛰어나 충분한 양의 Phl을 생성할 수 있는 집단을 형성하여 유지해야 된다 (Bull 등, 1991). 그러나 대부분의 생물적방제 세균은 근권에서의 집단이 시간이 지남에 따라 줄어들거나 병발생의 억제에 충분한 양의 길항물질을 지속적으로 생성하지 못한다.

이 문제점을 해결하는 하나의 방안으로 길항물질의 생합성에 관련된 유전자의 조작을 통하여 그 생성량을 높이려는 시도가 있어 왔다. Gutterson 등(1990)은 *P. fluorescens* Hv37a균주의 oomycin A의 생합성과 관련된 유전자의 promoter를 *tac* promoter로 치환하여 유전자의 발현을 constitutive하게 만들어 목화모잘록병(*Pythium*)의 방제효과를 증진하였다. 또한 Maurhofer 등(1992)은 *Pseudomonas fluorescens* CHA0에 같은 균주로부터 분리한 pyoluteorin (Plt) 생합성 유전자(22 kb)를 발현하는 pME3090을 도입하여 Plt의 생성량을 증가시키고, 오이모잘록병(*Pythium*)의 방제효과를 증진했다. Phl 생합성 유전자를 이용해서는 Hara 등(1995)이 PCA 생합성 유전자(12 kb)를 가진 pPHZ108A와 Phl 생합성 유전자(6.5 kb)를 가진 pPHL5122를 여러 *Pseudomonas* 균주에 도입하여 밀뿌리썩음병(*G. g. tritici*)의 방제효과가 증진되는 것을 관찰하였다.

외래유전자(heterogenous gene)의 도입은 현재까지 plasmid vector를 주로 이용하고 있다. 그러나 외래유전자가 세균내의 플라스미드에 있는 경우 토양 등의 자연환경에 처리하였을

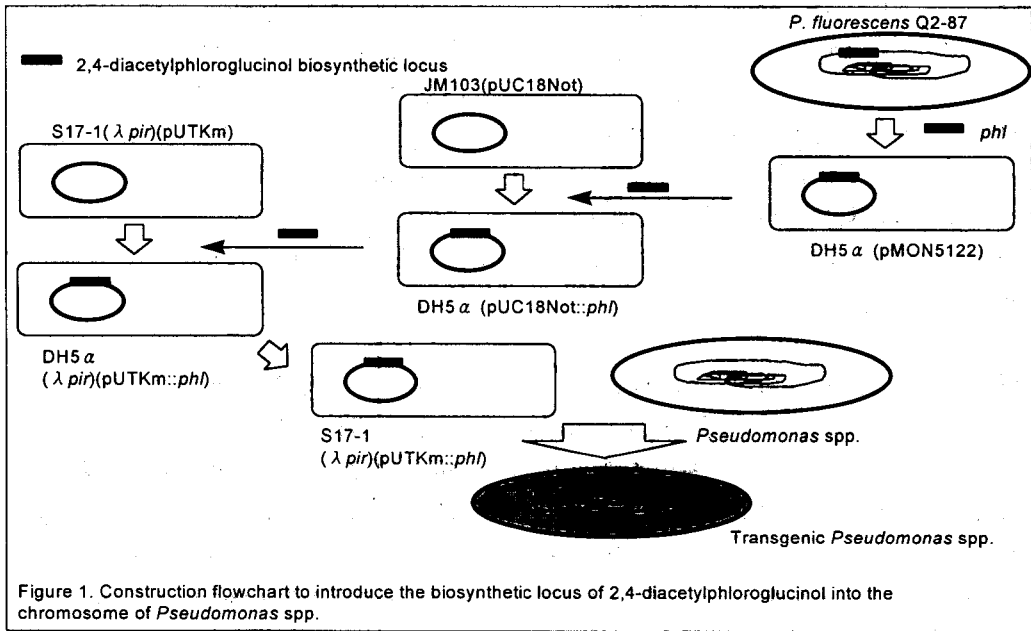
때 선택압(selection pressure)이 줄어 도입된 유전자가 안정적으로 세포안에 남아있지 못하거나 이웃의 미생물로 gene transfer가 일어날 확률이 높은 문제점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 이 연구에서는 de Lorenzo 등(1990)이 개발한 minitransposon Tn5에 *Phl* 생합성 유전자를 클로닝하여 세균의 염색체에 도입함으로써 형질전환을 시도하였다. 여기에서는 *Phl* 생합성 유전자의 도입과정과 형질전환 그리고 형질전환된 *Pseudomonas*의 특성을 살펴보면서 생물적방제 세균의 균주개발의 가능성을 살펴보기로 한다.

## 재료 및 방법

**균주 및 플라스미드** *G. g. tritici*와 *Pseudomonas* 균주들은 모두 워싱턴주립대학교에 있는 USDA-ARS에서 확보하였고, *Escherichia coli* 균주는 관련분야 과학자들로부터 분양을 받았다 (Table 1). *G. g. tritici*는 감자한천배지(PDA)에서 배양하였고, *E. coli* 균주는 Luria-Bertani (LB), *Pseudomonas* 균주의 일반적인 배양은 KMB(King's medium B), HPLC를 위해서는 YMB(yeast malt broth), *Pseudomonas*를 밀종자에 처리하여 생물학적 방제효과를 검정하기 위해서는 NBY(Nutrient-broth-yeast extract)를 이용하였으며, kanamycin과 ampicillin 등의 항생물질은 필요에 따라 첨가하였다.

Strain and plasmid	Characteristics	Source or reference
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> L118	Sensitive to <i>Phl</i>	USDA-ARS, Pullman, WA
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	F- <i>recA1 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 deoR</i> $\Delta$ ( <i>argF-lacZYA</i> ) U169 $\Phi$ 80d <i>lacZ</i> M15 $\lambda$ -	Bethesda Research Lab. (BRL)
DH5 $\alpha$ ( $\lambda$ pir)	F- <i>recA1 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 deoR</i> $\Delta$ ( <i>argF-lacZYA</i> ) U169 $\Phi$ 80d <i>lacZ</i> M15 $\lambda$ pir	J. Slauch
JM103	<i>endA1 hsdR supE44 sbcB thi-1 strA</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) [F' <i>traD36 proAB lacI</i> $\Delta$ M15]	D. Hanahan
S17-1( $\lambda$ pir)	Tp', Sm'; <i>recA thi pro hsdR</i> :M* RP4-2 $\lambda$ pir(Tc:Mu)(Km':Tn7)	Herrero et al., 1990
<i>Pseudomonas</i> spp.		Pierson et al., 1992
<i>P. chlororaphis</i> 30-84	Phz*, Rif'	Weller et al., 1983
<i>P. fluorescens</i> 2-79 (NRRL B-15132)	Phz*, Rif'	
<i>P. fluorescens</i> M4-80	Phl', HCN*, Rif'	Hamdan et al., 1991
<i>P. fluorescens</i> Q2-87	Phl', HCN*, Rif'	Vincent et al., 1991
<i>P. fluorescens</i> Q65c-80	Phl', HCN*, Rif'	Hara et al., 1994
<i>P. fluorescens</i> Q69c-80	Phl', HCN*, Rif'	Hara et al., 1994
<i>P. fluorescens</i> Q29z-80	Phl', HCN*, Rif'	Hara et al., 1994
Plasmid		
pMON5122	Tc', pRK415 with 7.0-kb genomic DNA fragment from pMON5121	
pUC18 Not	Amp': identical to pUC18 but with <i>NotI</i> /polylinker of pUC18/ <i>NotI</i> as MCS	Herrero et al., 1990
pUC18 Not: <i>phl</i>	Amp': identical to pUC18 but with an insertion of <i>phl</i> as MCS	This study
pUTKm	Amp', Km'; delivery plasmid for mini-Tn <sup>5</sup> Km	Herrero et al., 1990
pUTKm: <i>phl</i>	Amp', Km'; delivery plasmid for mini-Tn <sup>5</sup> Km: <i>phl</i>	This study

pUT::Km::phl 만들기 plasmid isolation, DNA restriction 및 ligation, competent cell preparation, transformation and transconjugation, electrophoresis 등은 일반적인 방법에 따라 실험하였고 필요한 경우 별도로 언급하였다(Sambrook 등, 1989). Phl 생합성 유전자를 얻는 것부터 형질전환된 *Pseudomonas*를 만드는 과정은 Figure 1과 같다. *E. coli* DH5 $\alpha$ (pMON5122)에 클론되어 있는 Phl locus(*phl*)를 *E. coli* JM103(pUC18Not)의 MCS(multiple cloning site)에 도입하고자, 각각의 플라스미드를 분리하여 *Eco*RI과 *Hind*III로 자른 후 ligation하여 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 transformation 시켰다. X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galctopyranoside)과 ampicillin을 첨가한 LB(LB<sub>X40amp100</sub>)에서 자라는 흰색 콜로니를 얻어, 플라스미드를 분리하고 agarose gel electrophoresis 이용하여 *phl*을 가진 *E. coli* DH5 $\alpha$ (pUC18Not::*phl*)를 선발하였다. pUC18Not::*phl*을 *Not*I로 잘라 *Not*I-*phl*-*Not*I을 얻어내고, 같은 제한효소로 pUT::Km를 잘라 ligation을 시도하였다. 이를 다시 *E. coli* DH5 $\alpha$ ( $\lambda$ *pir*)에 도입한 후 LB<sub>kan100amp100</sub>에 도말하여 *Not*I-*phl*-*Not*I 도입된 pUT::Km::*phl*을 선발하였다. pUT::Km::*phl*를 *E. coli* DH5 $\alpha$ ( $\lambda$ *pir*)에서 분리하여 다시 *E. coli* S17-1( $\lambda$ *pir*)에 transformation하였는데, 이는 transconjugation의 효율을 높이기 위한 것이다(de Lorenzo 등, 1994).



*E. coli* S17-1( $\lambda$ *pir*)(pUT::Km::*phl*)와 *Pseudomonas* spp.의 transconjugation Herrero 등 (1990)의 방법을 기본으로 donor인 *E. coli* S17-1( $\lambda$ *pir*)(pUT::Km::*phl*)를 각 recipient (2-79RN<sub>10</sub>, 30-84R, M4-80R, Q2-87R, Q65c-80R, Q69c-80R, and Q29z-80R)와 transconjugation 하였다. 이를 위해서 *E. coli* S17-1( $\lambda$ *pir*)(pUT::Km::*phl*)를 10 ml LB<sub>kan100amp100</sub>에 37°C에서 1일간 정치배양하고, *Pseudomonas*는 10 ml LB에 상온에서 1일간 진탕배양을 하였다. Donor와 recipient를 각각 5,000x g에서 5분간 원심분리한 후 1 ml LB에 현탁하고 donor의 30  $\mu$ l를 LB plate에 미리 올려놓은 membrane filter에 떨어뜨리고 그 위에 30  $\mu$ l의 recipient를 더하여 27°C 배양기에 LB

plate를 12시간 동안 두었다. Membrane filter를 1 ml의 살균증류수에 현탁하고 5,000x g에서 5분간 씻고 1 ml의 살균증류수에 현탁한 다음 이를 10배 비율로 희석하고 kanamycin이 첨가된 M9 최소배지(M9<sub>kan100</sub>) (Sambrook 등, 1989)에 도말한 후 27°C에서 3-5일 동안 배양하였다. 잘 자라는 *Pseudomonas*를 선발하여 KMB<sub>kan100</sub>에서 다시 배양하여 -80°C에 보관하면서 연구에 사용하였다.

**형질전환된 *Pseudomonas*의 배양적 특성** 형질전환균주(transgenic isolate)의 배양적 특성을 KMB<sub>kan100</sub> plate에 계대배양을 하면서 관찰하였다. 각 모균주로부터 형질전환된 각 5균주에 대하여 콜로니의 모양과 크기, 그리고 PhI의 생합성 과정에서 특이적으로 나타나는 red pigment(Bangera 등, 1994)를 기준으로 균주의 안정성을 일차적으로 조사하였다. 다른 모균주에서 얻은 형질전환균주와는 달리 Q69c-80R에서 얻은 형질전환균주들은 불안정하였는데, 이 가운데 20개를 선발하여 매 3일마다 10회에 걸쳐 KMB plate에 계대배양하면서 안정성을 조사하였다.

**Southern blot** 모균주와 각 모균주에서 얻어진 5개의 형질전환균주에 대하여 Southern blot을 실시하였다. Genomic DNA는 Ausubel 등(1990)의 방법으로 얻었으며, 각 genomic DNA는 *Sall* 또는 *EcoRV*로 절단하여, 0.7% agarose gel에서 전기영동하였다. DNA를 nylon membrane (Magangraph®, Micron Separations Inc. Westboro, MA)으로 옮겨 6.5-kb PhI locus를 probe로 사용하여 검색하였다. Probe labeling은 alkaline phosphatase를 이용한 BioNick Labeling System (Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)을 이용하였고, detection은 Photogene Nucleic Acid Detection System (BRL®, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)에 따라 수행하였다.

**HPLC** HPLC 분석을 위해 *Pseudomonas*를 4.0 ml YMB에 27°C, 200 rpm 조건에서 60 시간 동안 진탕배양하였다. 이들을 40 ml trifluoroacetic acid (TFA)에서 산성화 시킨 후 10 ml ethyl acetate를 이용하여 유기용매층에 녹아있는 PhI를 추출하였다. 이 유기용매층을 건조시킨 후 3.0 ml의 35% acetonitrile (ACN)과 0.1% TFA에 다시 녹였다. 이를 0.20 mm filter에 여과시킨 후 PhI의 농도를 HPLC(Waters Associates, Inc., Milford, MA)를 이용하여 조사하였다. 용매는 1.0 ml/min 속도로 유지하였고, 그 비율은 초기에 10% ACN/0.1% TFA로 시작하여 20분 후에는 100% ACN/0.1% TFA의 비율이 되도록 조정하였다. HPLC profile은 위의 조건에서 PhI에 특이적인 255와 270 nm에서 조사하였다.

**형질전환균주에 의한 밀뿌리썩음병(*G. g. tritici*) 방제효과** Q69c-80R과 이로부터 얻은 형질전환균주를 이용하여 밀뿌리썩음병의 발생억제효과를 생장조정실에서 tube assay 방법(Ownley 등, 1992; Kim, 1995)으로 실시하였다. 토양은 60°C에서 30분 동안 열처리(Pasteurization)하여 준비한 Puget silt loam과 Ritzville silt loam(Bull, 1991)을 이용하였다. *Pseudomonas* 균주를 25ml NBY에 24시간 동안 상온에서 배양한 후 원심분리(5000x g)하여 침

강시키고 3 ml methylcellulose(0.5%)에 현탁하여 6 g의 밀(cv. Penawawa)에 종자처리하여 사용하였다. 종자표면의 세균수는 dilution-plating 방법으로 조사하였다.

세균으로 처리한 종자는 원추형인 plastic tube(16.5 cm x 2.5 cm)에 *G. g. tritici*로 접종한 10 g의 각 토양을 넣은 후 tube 마다 두개씩 파종하였다. 처리는 분할구배치법 5반복으로 하였는데 반복당 5개의 tube를 사용하였다. 이들을 성장조정실로 옮겨 15°C, 95% 상대습도 조건에서 매주 2회 물을 주면서 3-4주간 키웠다. 4-5엽기에 이른 유묘의 뿌리를 씻어낸 후 Ownley 등(1992)이 개발한 scale(0 = no disease, 8 = plant dead or nearly so)을 이용하여 병 발생 수준을 조사하였다. 자료는 SAS의 GLM을 이용하여 처리간 유의성의 여부를 분석하고 유의성이 인정될 경우 처리간의 평균값 비교를 LSD를 이용하여 실시하였다.

## 결과 및 고찰

Minitransposon Tn5의 특성을 이용한 형질전환에서 7개의 모든 모균주 (2-79RN<sub>10</sub>, 30-84R, M4-80R, Q2-87R, Q65c-80R, Q69c-80R, Q29z-80R)와 *E. coli* S17-1( $\Delta$ pir)(pUT::Km::phl)를 transconjugation한 후 도달한 M9<sub>kan100</sub> plate에서 자라는 콜로니를 관찰하였다. 이는 minitransposon Tn5의 insertion sequence(IS)의 내부에 위치한 kanamycin 저항성 유전자와 Phl locus가 옮겨져 형질전환이 이루어졌음을 의미한다. *E. coli* S17-1( $\Delta$ pir)(pUT::Km::phl)는 *thi* auxotroph이고 *Pseudomonas*는 kanamycin-sensitive이기 때문에 각각은 M9<sub>kan100</sub> plate에서 자랄 수 없고, pUT::Km::phl가 *Pseudomonas*로 옮겨가야 콜로니가 자랄 수 있다. 또한 pUT::Km::phl에는 *Pseudomonas* 안에서 증식하는데 필수적인 *ori*(origin of replication)가 없기 때문에 pUT::Km::phl를 가지고 있는 *Pseudomonas*는 세대가 지나감에 따라 희석되어 없어지게 된다. 따라서 세균의 염색체에 유전자가 도입된 세균만이 자라게 된다. 더 나아가 minitransposon Tn5는 transposase-coding sequence(*tnp*\*)가 IS의 외부에 위치하고 있기 때문에 한번 도입이 되면 다시 움직이지 않고 외래유전자는 안정하게 남아 있게 된다(de Lorenzo 등, 1994).

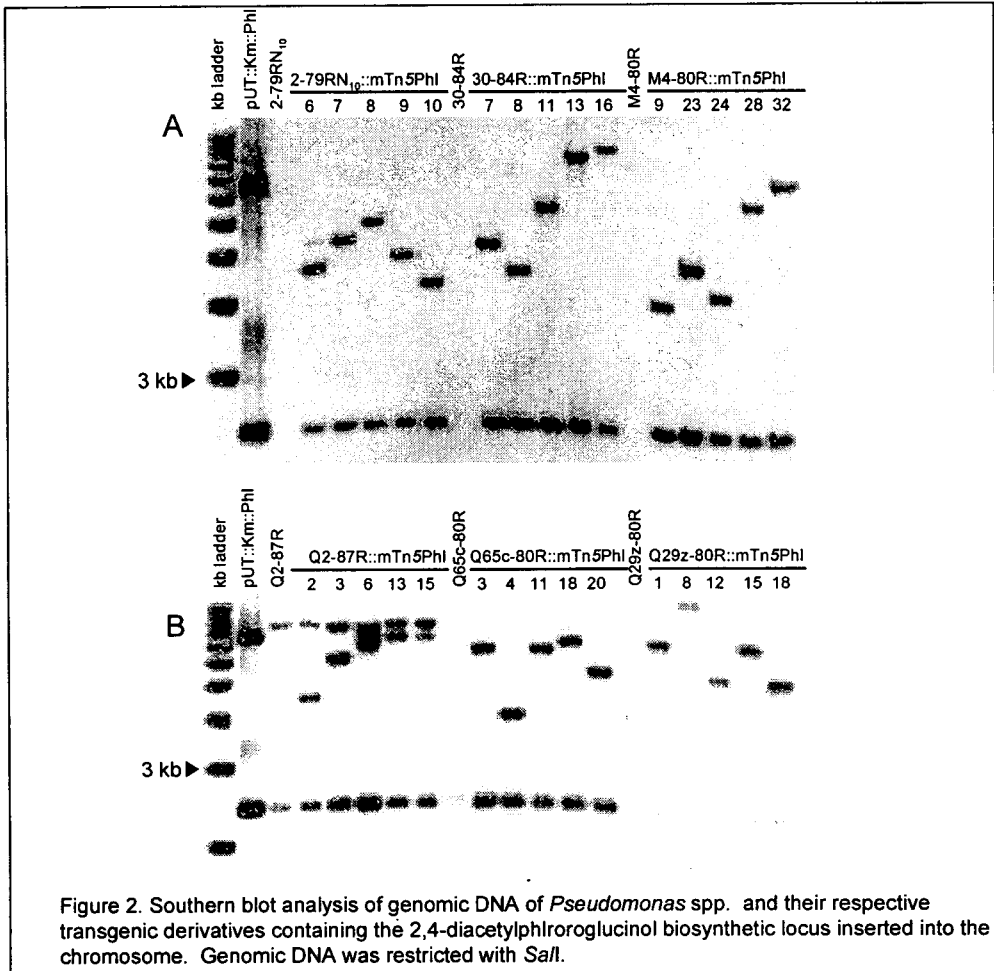
형질전환균주의 Phl locus 도입여부 및 유전자 발현은 KMB plate에 나타나는 적색소(red pigment)의 관찰을 통하여 일차적으로 판단하였다. 적색소의 생성은 Phl의 전구체인 monoacetylphloroglucinol의 산화에 의하여 나타나는 것으로 생각되고 있다(Bangera 등, 1994). 같은 transconjugation 조건에서 자란 콜로니 수는 모균주에 따라 달랐는데, M4-80R와 Q69c-80R는 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup>의 빈도로 상대적으로 다른 모균주보다 높았고, 30-84R, Q2-87R, Q29z-80R, Q65c-80R와 2-79RN<sub>10</sub>는 10<sup>8</sup>-10<sup>10</sup> 수준이었다.

각 모균주로부터 임의로 선발한 5개의 형질전환균주를 KMB에 계대배양하면서 관찰하였을 때, 대부분은 Phl을 추가적으로 생성하면서도 모균주와 비교하여 콜로니의 크기에는 가시적인 차이가 없었다. 적색소의 형성을 비교해 본 결과, 자연적으로 Phl를 생성하는 Q2-87R과 Q65c-80R로부터 얻은 형질전환균주는 각각의 모균주보다 더 붉었다. 자연적으로 세종류의 phenazine (PCA, 2-hydroxyphenazine-1-carboxylic acid, 2-hydroxyphenazine)을 생성하

며 황색소(organge pigment)를 나타내는 30-80R에서는 형질전환 후 황색소가 모든 형질전환 균주에서 관찰할 수 없었고 점차적으로 적색소가 나타났다, 원래 *Phl*을 생성하지 않는 2-79RN<sub>10</sub>, M4-80R과 Q29z-80R로부터 얻은 형질전환균주도 점차적으로 모두 붉게 변하였다.

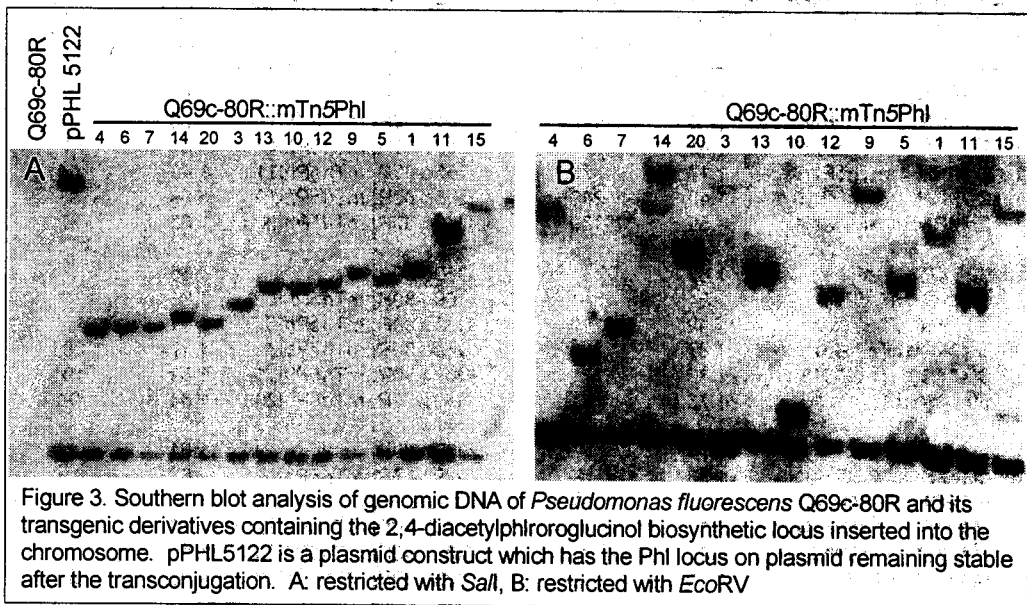
그러나, Q69c-80R로부터 얻어진 형질전환균주들은 적색소를 나타내는 것은 앞에서 언급한 형질전환균주와 같았지만, 콜로니의 크기가 작고 그 모양도 불규칙적이고 불안정하였다. 임의로 선발한 20개의 형질전환균주를 계대배양하면서 조사한 결과 일반적으로 적색소를 많이 만들수록 콜로니의 크기가 작고 불안정하고 적게 만들수록 모균주와 비슷하였다. Q69c-80R은 어떠한 길항물질도 생성하지 않으면서 밀뿌리썩음병(*G. g. tritici*)의 발생억제효과가 온실과 포장에서 앞에서 언급한 7개의 모균주 가운데 가장 뛰어난 균주이기 때문에, 길항물질의 추가적인 생성이 병발생의 억제에 미치는 효과를 연구하는 모델로 타당하다고 판단하였다. 대부분의 형질전환균주가 불안정하였지만 예외적으로 Q69c-80::mTn5*phl*20의 경우는 적색소도 많이 만들면서 콜로니의 크기도 모균주와 비슷하였다.

형질전환균주를 모균주를 바탕으로 각각 5개씩 선발하여 Southern blotting을 실시한 결과, *Phl* locus는 한번만 불특정적인 위치에 삽입된 것을 알 수 있었다 (Figure 2). 이들로부터



Genomic DNA를 *Sall*으로 자르고 Phl locus로 probing을 하였을 때 3개의 band가 나타났다. 두 band는 0.7과 2.3 kb로 일정하고 다른 한 밴드는 불규칙하였다. Herrero 등(1990)에 의하면 형질전환균주의 95% 정도가 marker로 사용한 kanamycin 유전자를 plasmid가 아닌 염색체에 가지고 있다고 한다.

Q69c-80R로부터 얻은 14개의 형질전환균주에 대하여 DNA blot hybridization을 해본 결과 모두가 불특정한 위치에 한군데만 있었다. (Figure 3). *Sall*로 잘라 실험했을 때 Q69c-80R::mTn5Phl4, 6, 7과 Q69c-80R::mTn5Phl0, 12, 13이 서로 비슷한 band 양상을 보이던 것이, 다른 제한효소인 *EcoRV*로 잘라 실험한 결과서로 다른 위치에 도입되었음을 확인할 수 있었다.



Southern blotting에 이용한 형질전환균주에 대하여 Phl생성량을 정량적으로 분석한 결과 균주간에 그 차이가 매우 컸다(Table 2). Phl 생성량은 2-79RN<sub>10</sub>의 경우 130-482 mg/A600, 30-84R는 0~327 mg/A600, M4-80R는 11~18 mg/A600, Q2-87R는 1~262 mg/A600, Q65c-80R은 1~87 mg/A600, Q69c-80R은 0.3~284 mg/A600, 그리고 Q29z-80R은 0~218 mg/A600 수준이었다. 주목할만한 것은 2-79RN<sub>10</sub>의 형질전환균주들은 Phl뿐만 아니라 PCA로 생성하는 반면, 30-84R의 형질전환균주들은 phenazine을 더 이상 만들지 못한다는 것이다 (Figure 4). 2-79RN<sub>10</sub>::mTn5Phl8 형질전환균주의 경우 Phl, PCA를 모두 생성하지만 모균주인 2-79RN<sub>10</sub>는 PCA만을 생성하고 다른 형질전환균주인 2-79RN<sub>10</sub>::mTn5Phl은 Phl만을 생성하였다. 자연에서 분리한 *Pseudomonas* spp. 중에는 *P. fluorescens* Pf-5와 CHO 균주 등과 같이 두가지 이상의 길항물질을 만드는 균주들이 상당수 있으나, PCA와 Phl을 동시에 만드는 균주가 보고된 경우는 전혀 없다. 그러나 이들에 의한 PCA 생성수준은 모균주보다는 낮았다.



Q69c-80R로부터 얻은 형질전환균주의 밀뿌리썩음병에 대한 방제효과를 모균주와 비교하여 조사한 결과 유의성이 있는 병발생의 억제효과는 관찰되지 않았다(Table 3). 따라서 다른 모균주로부터 얻은 형질전환균주의 방제효과에 대한 연구가 있어야 한다. 흥미로운 점은 세균의 집단이 수백배 적어도 비슷한 수준의 방제효과를 얻을 수 있다는 점이다. 또한 PhI을 많이 생성하는 균주는 밀종자의 출아를 억제하는 것을 억제하는 것을 관찰할 수 있었다. 밀뿌리썩음병의 방제효과, 세균의 성장 및 출아억제 등을 비교한 결과 Q69c-80R::mTn5PhI20이 형질전환균주 가운데 가장 뛰어났다.

Table 2. Growth and production of 2,4-diacetylphloroglucinol by *Pseudomonas* spp. and their respective transgenic isolates inserted with the PhI locus into the chromosome

Strain	Growth (A <sub>600</sub> )	PhI ( $\mu$ g/A <sub>600</sub> )	Strain	Growth (A <sub>600</sub> )	PhI ( $\mu$ g/A <sub>600</sub> )
2-79RN <sub>10</sub>	1.49	-	Q65c-80R	1.46	1
2-79RN <sub>10</sub> ::mTn5PhI6	1.10	482	Q65c-80R::mTn5PhI3	1.50	80
2-79RN <sub>10</sub> ::mTn5PhI7	1.45	614	Q65c-80R::mTn5PhI4	1.61	4
2-79RN <sub>10</sub> ::mTn5PhI8	1.17	376	Q65c-80R::mTn5PhI11	1.49	54
2-79RN <sub>10</sub> ::mTn5PhI9	1.49	240	Q65c-80R::mTn5PhI18	1.59	87
2-79RN <sub>10</sub> ::mTn5PhI10	1.59	130	Q65c-80R::mTn5PhI20	1.53	82
30-84R	1.82	-	Q69c-80R	1.35	-
30-84R::mTn5PhI7	1.54	-	Q69c-80R::mTn5PhI4	1.36	1
30-84R::mTn5PhI8	1.92	252	Q69c-80R::mTn5PhI5	1.31	170
30-84R::mTn5PhI11	1.87	233	Q69c-80R::mTn5PhI7	1.17	284
30-84R::mTn5PhI13	1.86	327	Q69c-80R::mTn5PhI11	1.89	101
30-84R::mTn5PhI16	1.78	-	Q69c-80R::mTn5PhI20	1.84	98
M4-80R	1.74	-	Q29z-80R	1.61	-
M4-80R::mTn5PhI9	1.53	11	Q29z-80R::mTn5PhI1	1.62	218
M4-80R::mTn5PhI23	1.45	16	Q29z-80R::mTn5PhI8	1.54	23
M4-80R::mTn5PhI24	1.54	11	Q29z-80R::mTn5PhI12	1.70	-
M4-80R::mTn5PhI28	1.43	18	Q29z-80R::mTn5PhI15	1.61	12
M4-80R::mTn5PhI32	1.31	15	Q29z-80R::mTn5PhI18	1.63	32
Q2-87R	1.09	25			
Q2-87R::mTn5PhI2	0.92	262			
Q2-87R::mTn5PhI3	0.91	261			
Q2-87R::mTn5PhI6	1.01	230			
Q2-87R::mTn5PhI13	1.06	5			
Q2-87R::mTn5PhI16	1.10	1			

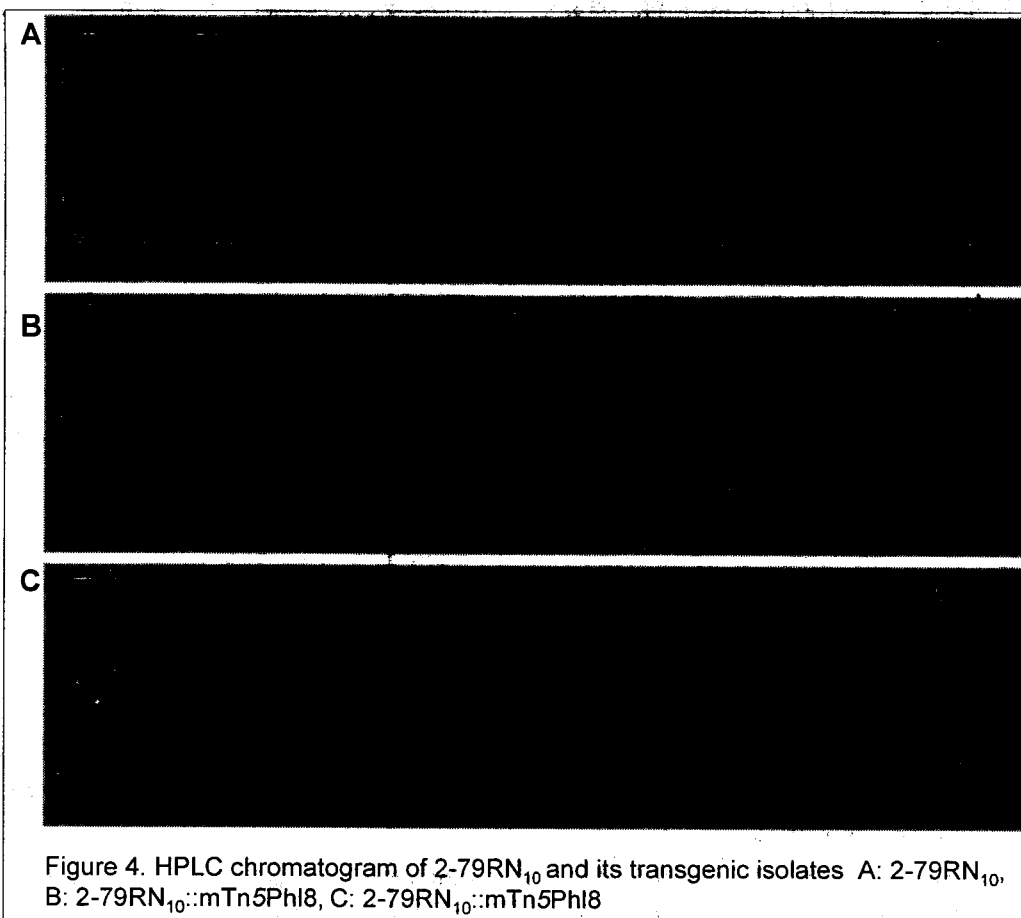


Table 3. Effect of *Pseudomonas fluorescens* Q69c-80R and its transgenic isolates each applied as a seed treatment on suppression of take all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in the growth chamber

Treatment	Dose (lcfu)	Shoot height(cm)	Disease severity	Emergence (%)
Nontreated	-	17.7 a	3.89 a	81 a
Q69c-80R	8.59	18.4 a	3.03 c	81 a
Q69c-80R::mTn5PhI4	8.68	17.5 a	3.46 b	84 a
Q69c-80R::mTn5PhI5	6.80	17.8 a	3.48 b	72 b
Q69c-80R::mTn5PhI7	5.90	17.7 a	3.44 b	85 a
Q69c-80R::mTn5PhI11	5.12	17.6 a	3.35 b	75 b
Q69c-80R::mTn5PhI20	6.14	18.0 a	2.95 c	82 a

Values with the same letter in each column are not significantly different at P=0.05 according to Fisher's protected LSD.

결론적으로 이 연구를 통하여 PhI 생합성 유전자를 *Pseudomonas*의 염색체에 효율적이고 안정적으로 도입하고 그 유전자를 다양하게 발현시킬 수 있는 체제는 정립되었다. 이는 PhI 생합성 유전자 뿐만 아니라 다른 유전자들도 필요에 따라서 형질전환을 시킬 수 있음을 의미한다. 앞에서 언급된 것처럼 PhI의 생성은 고농도에서 식물의 생육을 억제하고(Keel 등, 1990; Maurhofer 등, 1992), 세균의 성장자체를 방해하기 때문에, PhI을 많이 생성하는 형질전환균주가 반드시 병발생 억제효과도 좋다고 볼 수는 없었다. 따라서 이러한 부작용이 없는 수준의 PhI을 생성하거나 Q69c-80::mTn5PhI20처럼 예외적인 균주를 다시 선발해야 하는 과정이 요구된다. 또한 균주간의 차이가 있는 것을 고려할 때, Q69c-80R 이외의 6개 모균주로부터 얻은 형질전환균주의 병발생 억제효과에 대한 실험이 필요한 실정이다. 특히 PhI과 PCA를 동시에 생성하는 형질전환균주의 방제효과에 대한 연구는 그 귀추가 주목된다. 나아가 근권에 살고 있는 *Pseudomonas*를 이용하여 생물학적 방제능력을 향상시키기 위해서는 phenazine, pyrrolnitrin, pyoluteorin 등의 다른 길항물질 생합성 유전자를 도입하여 연구할 필요가 있다.

## 인 용 문 헌

- Ausubel, F. M. R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl. 1990. Current Protocols in Molecular Biology. Green Publishing Associates/Wiley-Interscience, New York.
- Bangera, M. G., L. S. Thomashow. 1996. Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol by the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. Mol. Plant-Microbe Interact. 9:83-90.
- Bull, C. T., D. M. Weller, L. S. Thomashow, L. S. 1991. Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. Phytopathology 81:954-959.
- de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jacobzik, K. N. Timmis. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. J. Bacteriol. 172:6568-6572.
- de Lorenzo, V., K. N. Timmis. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. Methods in Enzymol. 235:386-405.
- Fenton, A. M., P. M. Stephens, J. Crowley, M. O'Callaghan, F. O'Gara. 1992. Exploitation of genes involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. Appl. Env. Microbiol. 58:3873-3878.

- Gutterson, N. 1990. Microbial fungicides recent approaches to elucidating mechanisms. Cr. Rev. Biotechnol. 10:69-91.
- Hara, H., M. Banger, D.-S. Kim, D. M. Weller, L. S. Thomashow. 1994. Effect of transfer and expression of antibiotic biosynthesis genes on biological control activity of fluorescent pseudomonads. Pages 247-249 in: Improving Plant Productivity with Rhizobacteria. M. H. Ryder, P. M. Stephens, and G. D. Bowen, eds. CSIRO Division of Soils, Adelaide.
- Herrero, M., V. de Lorenzo, K. N. Timmis. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 172:6557-6567.
- Keel, C., U. Schnider, M. Maurhofer, C. Voisard, J. Laville, U. Burger, P. Wirthner, D. Haas, G. Defago. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. Mol. Plant-Microbe Interact. 5:4-13.
- Keel, C., P. H. Wirthner, T. H. Oberhansli, C. Voisard, U. Burger, D. Haas, G. Defago. 1990. Pseudomonads as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: Role of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. Symbiosis 9:327-341.
- Kim, D. S. 1995. Biological control of root diseases of wheat and other crops with root-associated *Bacillus* and transgenic *Pseudomonas* species. Ph.D. Thesis. Washington State Univ., Pullman, Washington. 200 pp.
- Kloepper, J. W., M. N. Schroth, M. N., T. D. Miller. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. Phytopathology 70:1078-1802.
- Maurhofer, M., C. Keel, U. Schnider, C. Voisard, D. Haas, G. Defago. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. Phytopathology 82:190-195.
- Ownley, B. H., D. M. Weller, L. S. Thomashow. 1992. Influence of *in situ* and *in vitro* pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Phytopathology 82:178-184.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. A. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Schroth, M. N., J. G. Hancock. 1982. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. Science 216:1376-1381.
- Shanahan, P., J. D. Glennon, J. J. Crowley, D. F. Donnelly, F. O'Gara. 1993. Liquid chromatographic assay of microbially derived phloroglucinol antibiotics for establishing the biosynthetic route to production, and the factors affecting their regulation. Anal. Chim. Acta 272:271-277.

- Suslow, T. V., M. N. Schroth. 1982. Rhizobacteria of sugarbeets: Effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology* 72:199-206.
- Thomashow, L. S., D. M. Weller. 1995. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: Mechanisms and antifungal metabolites. Pages 187-235 in: *Plant-Microbe Interactions*, Vol. 1. G. Stacey and N. T. Keen, eds. Chapman and Hall, New York. 316 PP.
- Vincent, M. N., L. A. Harrison, J. M. Brackin, P. A. Kovacevich, P. Mukerji, D. M. Weller, E. A. Pierson. 1991. Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2928-2934.