

## 식물 성장촉진 미생물의 외부 유전자 도입과 그 접종효과

이영환 · 김광식 · 김용웅 · 김영일

전남대학교 농과대학 농화학과

**초록** : 토양전염 병원성 사상균인 *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*에 대하여 길항력을 갖는 균주 *Bacillus subtilis*를 근권 토양에서 분리하여 동정한 후 이들 균주의 사상균에 대한 길항력, 발아율 및 작물의 생육에 미치는 영향력을 검토하였다. 또한 이 균주의 chromosome에 *Bacillus thuringiensis*(BT) 독소유전자를 삽입하여 균주의 형질변환을 유도하였다. BT 독소 유전자는 southern blotting에 의하여 확인되었으나 이의 최종 생성물인 독소 단백질은 SDS-PAGE에 확인되지 않았다. 이들 형질변환된 균주의 생리 및 생화학적 특성을 조사한 결과 모균주와 차이는 없었으며, BT 독소유전자가 삽입된 균주는 선충의 유충에 대한 생물학적 검정에서는 효과가 인정되지 않았으나 누에에 있어서는 1X 균체 희석액에서 10내지 20% 정도의 치사율이 관찰되었다. 모균주와 BT 독소유전자에 의하여 형질변환된 균주 모두 발아율 및 작물의 생육을 향상시켰다(1992년 6월 25일 접수, 1992년 8월 21일 수리).

*B. subtilis*는 호기성 간균으로  $1 \times 10^5$  CFU/g dry soil 정도로 일반 토양에서 서식하고 있으며, 생체내에 내성 포자를 형성하여 다양한 환경변화에 대해서 잘 적응하여 병원성 미생물들에 대하여 길항력을 갖는 유용한 미생물로 알려져 있다.<sup>1,2,16,24</sup> 근래에는 이러한 *B. subtilis*를 이용하여 병원성 사상균인 *R. solani*, *Sclerotium cepivorum*, *Streptomyces scabies*, *F. oxysporum* 등을 생물학적으로 방제하는 연구가 이루어지고 있다.<sup>3,5-7,17</sup>

해충의 방제를 목적으로 연구되고 있는 살충성 미생물 가운데는 *B. thuringiensis*가 가장 활발히 연구되어 실용화 단계에 있다.<sup>12,15</sup> 이러한 BT 독소는 포자형성시기에 생성되는 결정 단백질로서 이들은 햇빛이나 생화학적 분해과정에 의해 쉽게 분해되며 인축에 대한 해는 없는 것으로 알려져 있다. 또한 BT 독소를 이용한 연구의 범위가 작물의 지상부를 가해하는 인시목, 쌍시목, 초시목 등의 유충에 국한되어 있기 때문에, BT 독소 유전자를 근권 길항미생물에 삽입, 발현하게 하여 토양, 특히 연작토양 등에서 피해를 주는 선충 등의 구제에 대한 연구는 의미가 있으리라 본다. 즉 BT 독소 또는 독소생성 미생물을 작물에 처리하였을 때 독소의 안정성에 대한 문제가 야기될 수 있으나 BT 독소유전자를 근권 길항미생물에 삽입시켜 토양내에 처리하였을 경우 이러한 문제는 현저하게 감소될 수 있다.

본 연구에서는 시설 원예 작물에 병해를 일으키는

병원성 사상균에 대하여 길항력이 우수하며 작물 생육 촉진효과가 있는 근권미생물인 *B. subtilis*를 분리 선발하고, 이들 균주에 BT 독소유전자를 갖는 plasmid를 삽입하여 이들 균주를 형질변환시킨 후 BT 독소유전자의 발현유무, 생리 생화학적 성질의 변화 유무를 조사하였다. 또한 이들 균주의 사상균에 대한 저해력, 작물의 발아 및 성장에 대한 효과 등을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### *Bacillus* 균주의 분리 및 동정

소맥, 고추, 옥수수, 양파 재배지의 작물 근권 토양 30g을 0.01 M tris-HCl buffer solution(pH 7.2) 270 ml로 15분간 왕복진탕한 후, 이액 0.10 ml를 加藤의 B-2 배지<sup>11</sup>에 접종하고 50 °C에서 24시간 배양하여 single colony의 *Bacillus*를 분리하였다. 분리된 *Bacillus* 중에서 길항력이 우수한 균주를 선발하기 위하여 병원성 사상균인 *F. oxysporum*, *R. solani*를 PDA배지<sup>9</sup>에 희선 접종하여 30 °C에서 24시간 배양한 후 1 cm 간격으로 1차 선발균주를 평행하게 희선 접종하여 30 °C에서 7일간 배양하고 사상균의 저해력을 관찰하였다. 병원성 사상균에 길항력이 우수한 균주를 선발하여, the prokaryotes,<sup>22</sup> bergeys manual of systematic bacteriology,<sup>16</sup> microbiological method<sup>9</sup>에 기술된 방법에 따라 starch, gelatin의 가수

Key words : Antagonistic bacteria, *Bacillus subtilis*, BT toxin gene  
Corresponding author : Y. H. Rhee

분해력, glucose, sucrose, rhamnose, mannitol, sorbitol 등 탄소원 자화성과 Gram 염색성, 편모형태 및 생리 생화학적 특성 등을 검토하였다.

**Plasmid의 구성과 subcloning 및 Bacillus의 형질전환**

필요한 plasmid는 Molecular cloning<sup>13)</sup>에 기술된 방법에 따라 *E. coli* HB101에 삽입시켜 증폭시킨 후에 miniprep 방법<sup>14)</sup>으로 추출 정제하고, 추출된 plasmid는 제한효소로 절단하여 agarose gel electrophoresis를 이용하여 plasmid를 확인 후에 사용하였다. DNA fragment가 필요한 경우에는 vector에 삽입되어 있는 DNA fragment를 제한효소로 절단한 후 low melting agarose를 이용한 전기영동법으로 분리 회수한 후 phenol/chloroform으로 정제하여 사용하였다. 한편 *Bacillus*에서 plasmid의 추출은 recombinant DNA techniques<sup>15)</sup>에 기술된 방법에 따라 추출 정제하였으며 제한 효소로 절단한 후 agarose gel electrophoresis를 이용하여 plasmid를 확인하였다. Plasmid DNA에 의한 *Bacillus*의 형질전환은 Chang과 Cohen의 방법<sup>9)</sup>에 따라 protoplast를 만들고 이 protoplast에 plasmid를 삽입한 후 protoplast를 재생배지에 도말하고 여기에 나타난 colony를 neomycin을 함유한 배지에 다시 도말 접종하여 neomycin에 내성을 갖는 colony를 선택하였다.

**DNA 추출과 southern blotting**

*Bacillus*를 potato dextrose 액체배지에서 배양한 후 원심분리하여 회수된 bacterial pellet를 tris buffer(tris-HCl 20 mM EDTA 10 mM, pH 7.6)로 현탁시키고, lysozyme(최종 농도 1 mg/ml)을 처리하여 37℃에서 1시간 정치한 후에, sarcosyl을 최종 농도가 1% 되도록 가하여, DNA를 노출시키고 proteinase K를 최종 농도 800 mg/l로 처리하여 37℃에서 1시간 정치시키고 phenol/chloroform으로 정제한 후에 사용하였다. 추출된 DNA는 제한효소로 처리한 후 0.7% agarose gel을 이용하여 전기영동시켰으며, 전기영동된 DNA는 molecular cloning<sup>14)</sup>에 기술된 방법에 따라 nitrocellulose paper로 전이시켜 southern blotting에 사용하였다. Hybridization에 필요한 probe는 primer extension 방법<sup>14)</sup>으로 <sup>32</sup>P isotope와 plasmid DNA를 사용하여 조제하였다.

**SDS-PAGE에 의한 단백질 분석**

*BT* 독소유전자가 삽입된 균주가 생성하는 독소단백질의 분석은 Laemmli<sup>13)</sup>와 Shivakumar 등<sup>19)</sup>의 방법을 변용하여 실시하였다. 제조할 균주를 potato dextrose 액체배지에서 37℃, 24시간 배양한 다음 균체를 회수

하였다. 회수된 균체는 TESP buffer(30 mM tris-HCl pH 7.6), 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 2 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride)로 현탁한 다음 80 μA로 ultrasonication하여 단백질 분석 시료로 사용하였다. 시료와 sample buffer(SDS 0.02g, glycerol 0.1g, β-mercaptoethanol 50 μl, 15 μg Bromo-thymol blue/ml, 0.5 M tris 62.5 μl, pH 6.8)를 1:1로 혼합한 후 전기영동하였다. 표준 단백질로는 myosin(M.W. 205 KD), beta-galactosidase(M.W. 116 KD), phosphorylase B(M.W. 97.4 KD), bovine serum albumin(M.W. 66 KD), egg albumin(M.W. 45 KD) 그리고 carbonic anhydrase(M.W. 29 KD)을 함유하고 있는 Sigma 제품(cat. # SDS-6 H)을 사용하였다. 전개된 gel은 0.25% coomassie brilliant blue G-250으로 염색하여 7% acetic acid로 탈색하였다.

**작물의 발아 및 성장에 미치는 영향**

액체배양한 균주와 병원성 사상균을 원심분리(6,000 ×g, 10 min)로 회수한 후, 증류수를 가하여 균체의 농도가 1×10<sup>8</sup> CFU/ml되도록 균체 현탁액을 만들고, 이 현탁액을 직경 9 cm의 petri dish내의 2겹의 마른 filter paper에 균주와 사상균 현탁액을 5 ml씩 접종한 다음 종자 100립씩을 파종하여 30℃에서 3내지 4일간 배양하여 발아율을 조사하였다. 또한 연작지 토양의 pot에 균주와 사상균의 배양액을 1×10<sup>8</sup> CFU/g dry soil 수준으로 접종한 후, 배추를 파종하고 배추의 발아율, 병 발생 및 생육을 경시적으로 관찰하였다.

**생물학적 검정**

*BT* 독소유전자에 의해 형질전환된 공시균주를 LB배지에서 24시간 배양한 후 회수하고 멸균수로 원래 배양액 용적의 1×, 10×, 100×, 1000×배지가 되도록 희석액을 만들었다. 이 희석액에 병잎을 담가 병잎에 균체를 고르게 처리한 후 제3령기의 누에(*Bombix mori*)를 25℃에서 48시간 동안 사육하여 mortality를 계산하였다. 한편 위의 1×, 10×, 100×, 1000×배로 희석된 균체액에 *Botrytis*속 사상균을 배지로 사육한 2령기의 선충(*Bursaphelenchus xylophilus*)의 유충을 1,000마리/ml 수준으로 처리하여 25℃에서 24시간 정치한 후 mortality를 조사하였다.

**결과 및 고찰**

***Bacillus* 균주의 분리 및 동정**

식물 병원성 사상균들은 토양속에서 장기간 생존하며 병해를 일으키기 때문에 작물병해의 중요한 원인이 되고

있다. 이러한 식물병원성 사상균들에 대해 *Bacillus*속 세균이 길항력을 가지며 작물의 생육을 촉진한다는 보고<sup>5)</sup>에 따라 加藤의 B-2 선택 배지<sup>11)</sup>를 이용하여 소맥, 고추, 옥수수, 양파 등의 연작지 작물 근권에서 백색의 특징적인 colony를 형성하는 *Bacillus*속 균주를 1차로 분리하였다.

식물 병원성 사상균인 *R. solani*, *F. oxysporum* 등에 대하여 길항력이 우수한 균주를 선별하기 위하여 1차로 선별된 균주를 PDA배지 상에서 대치 배양한 결과 길항력이 가장 우수한 B-4와 B-5를 공시 균주로 최종 선별하였다. 식물 병원성 사상균에 대해 길항력이 가장 우수한 B-4, B-5 공시균주의 생리, 생화학적 성질을 검토한 결과 모두 Gram 양성의 간균으로 편모는 없었으며 운동성을 띄고 있었다. *Bacillus*나 *Clostridium*속의 세균들은 내생 포자를 형성하여 물리적, 화학적 외부 환경의 변화에 상당한 내성을 갖는 것으로 알려지고 있는데 공시균주도 모두 이러한 내생포자를 형성하는 특징을 가지고 있었다. 분리된 공시균주가 catalase, Voges-proskauer 반응, starch 및 gelatin의 가수분해력 등에서는 양성반응을 나타냈으며 혐기적인 상태에서는 전혀 생육하지 못하였다.

한편 Microbiological method<sup>9)</sup>에 기술된 방법에 따라 ammonium salt agar 배지로 탄소원 화합성 실험을 한 결과 glucose, arabinose, lactose, sorbitol, mannitol, sucrose, fructose, Na-citrate 등을 탄소원으로 이용하였으나 rhamnose는 탄소원으로 이용하지 못하였다. 이러한 성질로 미루어 Bergey's manual<sup>16)</sup>과 the prokaryotes<sup>22)</sup> 등에 기술된 分類 基準에 의해 B-4와 B-5를 *B. subtilis*로 분류 동정하였다.

**Bacillus의 chromosome에 BT 독소유전자의 삽입**

공시균주 B-5에 BT 독소유전자를 삽입하기 위해 *Bacillus*용 vector인 plasmids pCPP4<sup>10)</sup>를 이용하여 pCPPBT와 pCPPBTR를 작성하였다. 이를 위해 Fig. 1에서와 같이 plasmid pES1<sup>19)</sup>의 6 kilo base(kb) *EcoRI* site 내에 존재하는 BT toxin gene을 얻기 위해 plasmid pES1을 *EcoRI*으로 처리하고 low melting agarose gel을 이용한 전기영동법으로 분리한 후 회수 정제하였다. 회수된 DNA fragment양쪽 끝 부분을 linker를 이용하여 *BamHI* site로 변경한 후 pCPP4<sup>10)</sup>의 *BamHI* 위치에 subcloning 하였다. plasmid 내에서 각각 다른 방향으로 갖는 BT 독소유전자를 확인하고 이 두 plasmid를 pCPPBT와 pC-

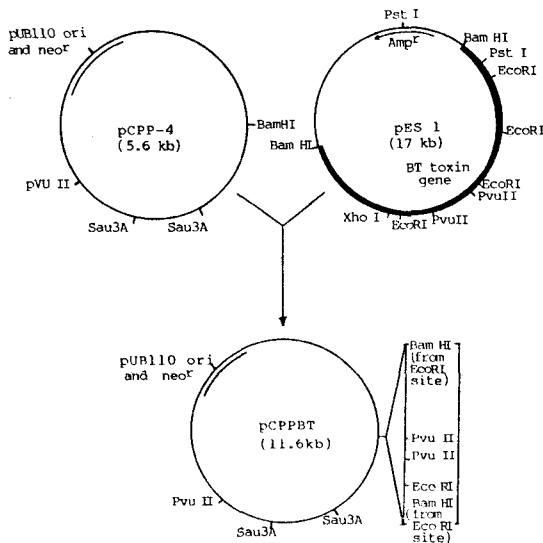


Fig. 1. Construction of the plasmid pCPPBT.

The 6 kb DNA fragment between *EcoRI* sites of pES1 was isolated. The *EcoRI* ends were modified to give *BamHI* site. This DNA fragments was inserted into the *BamHI* site, treated with alkaline phosphatase of pCPP4. The name of pCPPBTR was given to the plasmid with a different orientation of the inserted DNA fragment.

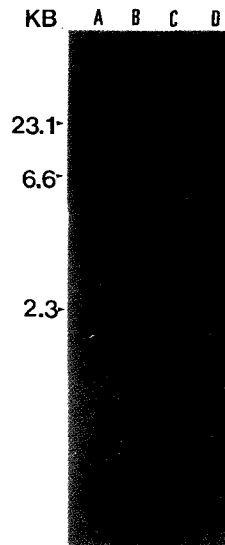


Fig. 2. Southern analysis of the bacterial DNAs.

The chromosomal DNAs of *B. subtilis* were digested with *BamHI* restriction enzyme and separated in a 0.7 % agarose gel before transferred to a nitrocellulose paper and hybridization. Blot was probed with <sup>32</sup>P labeled 6.0 kb *BamHI* fragment from pCPPBT plasmid, A; B5(pCPPBT) # 1, B; B5(pCPPBT) # 2, C; B5(pCPPBTR) # 1, D; B-5.

PPBTR이라 명명하였으며, 효율적인 외부유전자 도입을 위해 이 plasmid를 B-5 균주의 chromosome에 삽입<sup>8)</sup>시켜 형질전환된 B-5 균주를 B5(pCPPBT)와 B5(pCPPBTR)이라 명명하였다.

BT 독소유전자가 삽입된 균주 B5(pCPPBT)#1 B5(pCPPBT)#2 B5(pCPPBTR)#1에서 BT 독소유전자를 확인하기 위해서 균주에서 각각 추출된 5 µg씩의 chromosomal DNA를 제한효소 BamHI로 절단한 후, <sup>32</sup>P isotope로 labelling한 plasmid pCPPBT의 6.0 kb BamHI fragment를 probe로 하여 southern blotting한 결과 Fig. 2에서처럼 균주 B5(pCPPBT)#1(lane A), B5(pCPPBT)#2(lane B), B5(pCPPBTR)#1(lane C)의 DNA에서 BT 독소유전자 band를 볼 수 있었다. 완전한 BT 독소유전자가 삽입된 균주의 DNA를 BamHI 효소로 절단하고, plasmid pCPPBT의 6.0 kb BamHI fragment를 probe로 하여 southern blotting할 경우 대략 6.0 kb의 band가 있어야 하는데 위 경우 형질전환 균주 모두 이러한 band pattern을 보이고 있었으나 band의 pattern과 수가 균주마다 상이한 것으로 보아 DNA가 삽입된 위치가 서로 상이함을 알 수 있었다.

SDS-PAGE에 의한 단백질 분석 및 생물학적 검증

*B. subtilis*에 삽입된 BT 독소유전자의 최종 생성물인 독소단백질의 생성여부를 SDS-PAGE로 분석한 결과는 Fig. 3과 같다. BT 독소단백질은 135 KD와 66 KD 가지

형태로 존재하며 나비목 유충 등에 살충력을 갖는 독소 단백질로 알려져 있다.<sup>4)</sup> SDS-PAGE에서 BT 독소유전자에 의한 형질전환 균주에서 BT 독소 단백질로 추정되는 단백질의 band가 확인되지 않는 것으로 보아 삽입된 유전자가 염색체와 재조합되면서 유전자 일부분이 상실되었거나 삽입된 일부 유전자가 다른 유전자의 자리에 위치하여 분자량이 상이한 융합 단백질이 생성되었던지 RNA 해독기작에 이상이 있어 해당 단백질이 생성되지 않았을 것으로 추정된다. 한편 DNA로부터 RNA가 생성되는지의 여부를 알아 보기 위하여 RNA dot blotting으로 確證한 형질전환 균주에서 BT 독소유전자의 transcriptional activity는 양호하였다(data not shown).

BT 독소유전자가 삽입된 형질전환 균주의 곤충에 대한 생물검정에서 BT 독소유전자를 갖는 형질전환 균주가 갖는 살충율은 누에(*Bombix mori*)에 있어서 1× 균체 희석액에서 10내지 20%로 BT 독소유전자가 cloning된 plasmid pCPPBT를 갖는 *E. coli*의 100%에 비해 현저히 감소하였다. 한편 선충(*Bursaphelenchus xylophilus*)의 유충에 대한 BT 독소의 효과는 전혀 인정되지 않았다. 이러한 살충율에 관한 결과를 위의 southern blotting, RNA dot blotting, SDS-PAGE 결과와 함께 고려하면 균주세포내의 BT 독소유전자가 염색체로 삽입되며 일

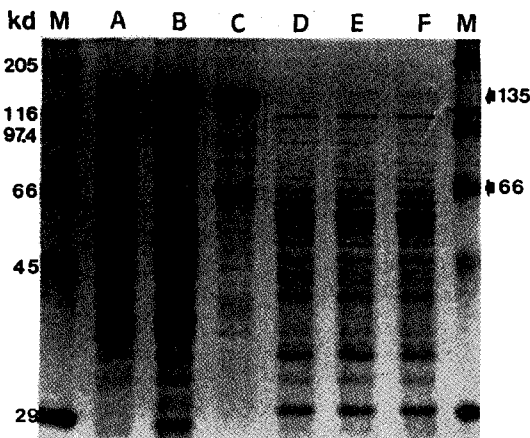


Fig. 3. SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoresis was carried out in a 10% polyacrylamide gel. The allow head indicates a aize of BT toxin product. M; marker (Sigma SDS-6H), A; *E. coli* HB101, B; *E. coli* HB101 containing plasmid pCPPBT, C; *Bacillus* (ATCC37669), D; B5(pCPPBT)#1, E; B5(pCPPBT)#2, F; B5(pCPPBTR)#1.

Table 1. Inoculation effects of *B. subtilis* on seed germination *in vitro* of sesame and chinese cabbage

| Bacteria inoculated | Fungi inoculated    | Germination (%) |        |
|---------------------|---------------------|-----------------|--------|
|                     |                     | Chinese cabbage | Sesame |
| ATCC6633            | <i>R. solani</i>    | 89              | 86     |
|                     | <i>F. oxysporum</i> | 92              | 86     |
|                     | None                | 98              | 96     |
| B-4                 | <i>R. solani</i>    | 93              | 87     |
|                     | <i>F. oxysporum</i> | 86              | 86     |
| B-5                 | <i>R. solani</i>    | 84              | 86     |
|                     | <i>F. oxysporum</i> | 92              | 92     |
|                     | None                | 98              | 98     |
| B5(pCPPBT)#1        | <i>R. solani</i>    | 86              | 90     |
|                     | <i>F. oxysporum</i> | 90              | 90     |
|                     | None                | 92              | 95     |
| B5(pCPPBTR)#1       | <i>R. solani</i>    | 81              | 80     |
|                     | <i>F. oxysporum</i> | 94              | 90     |
|                     | None                | 94              | 85     |
| None                | <i>R. solani</i>    | 64              | 68     |
|                     | <i>F. oxysporum</i> | 68              | 62     |
| None                | None                | 86              | 82     |

Table 2. Inoculation effects of *B. subtilis* on growth of chinese cabbage on 21 days after sowing in pot experiment

| Bacteria inoculated | Fungi inoculated    | Flesh weight (g) | No. of leaves | Length of height (cm) | Length of root (cm) |
|---------------------|---------------------|------------------|---------------|-----------------------|---------------------|
| ATCC6633            | <i>R. solani</i>    | 11               | 7             | 17                    | 10                  |
|                     | <i>F. oxysporum</i> | 11               | 7             | 16                    | 11                  |
|                     | None                | 14               | 7             | 14                    | 15                  |
| B-5                 | <i>R. solani</i>    | ND               | ND            | ND                    | ND                  |
|                     | <i>F. oxysporum</i> | ND               | ND            | ND                    | ND                  |
|                     | None                | 12               | 7             | 13                    | 17                  |
| B5(pCPPBT) # 1      | <i>R. solani</i>    | 10               | 7             | 13                    | 17                  |
|                     | <i>F. oxysporum</i> | 10               | 7             | 11                    | 17                  |
|                     | None                | 12               | 7             | 14                    | 15                  |
| B5(pCPPBTR) # 1     | <i>R. solani</i>    | 11               | 7             | 17                    | 10                  |
|                     | <i>F. oxysporum</i> | 11               | 7             | 16                    | 11                  |
|                     | None                | 13               | 7             | 17                    | 12                  |
| None                | <i>R. solani</i>    | 7                | 6             | 9                     | 10                  |
|                     | <i>F. oxysporum</i> | 6                | 7             | 9                     | 7                   |
| None                | None                | 7                | 7             | 11                    | 9                   |

어는 제조과정에서 필요한 유전자의 일부를 상실한 불완전한 유전자가 삽입 발생되고 이에 따라 생성된 최종 독소단백질이 제 기능을 다하지 못하는 것으로 추정된다.

#### 균주가 작물의 발아 및 생육에 미치는 영향

균주가 배추 및 참깨의 발아와 배추의 성장에 미치는 영향을 검토하였다. 공시균주가 작물의 발아에 미치는 영향은 Table 1과 같이 배추의 경우 대조구(86%)에 비해 공시균주 처리구에서 전반적인 발아의 향상이 관찰되었으며 특히 B-5(98%)와 *B. subtilis* ATCC6633(98%) 단독처리시 가장 높은 발아율 보였다. 참깨의 경우 배추에서의 결과와 유사하였고 대조구(82%)에 비해 공시균주 단독 처리구에서 발아율이 향상되었는데 B-5 처리구(98%)에서 가장 우수하였다. 한편 배추와 참깨 모두 모균주와 형질전환 균주 사이에 있어서 뚜렷한 경향은 없었으나 모균주에 비해 형질전환 균주의 처리구에서 발아율이 감소되는 경향을 나타내었다. 또한 사상균과 공시균주의 동시 처리구 보다 공시균주 단독 처리구에서 발아율이 향상된 반면 *P. oxysporum*과 *R. solani*만의 단독 처리구에서는 발아가 현저하게 저해되었다. 따라서 이러한 결과로 공시균주는 발아의 촉진효과 및 사상균에 대한 길항효과가 있는 것으로 추정된다.

또한 균주가 작물 근권에서 병발생의 억제 및 작물 생육촉진 효과에 미치는 영향을 검토하고자 연작지 토양을 이용한 pot에 공시균주를 접종한 후 배추를 파종하여 생육초기의 병발생 및 성장에 미치는 영향을 경

시적으로 관찰한 결과 Table 2와 같이 접종 및 파종 21일 후 신선중, 엽수, 초장 및 근장에서 모두 무처리 대조구 및 사상균 단독 처리구에 비해 현저한 촉진효과가 관찰되었으며, 균주와 사상균을 동시 접종한 처리구 보다 균주 단독처리구에서 전반적인 성장이 촉진되었고, 모균주 처리구보다 형질전환 균주의 처리구에서 전반적인 성장의 저하가 관찰되었다. 따라서 균주의 처리는 배추의 병 발생 억제효과와 엽수, 초장, 근장, 신선중 등에 있어서 성장촉진 효과가 있는 것으로 판단된다.

#### 사 사

본 연구는 1989년도 한국과학재단의 연구비(891-1502-055-1) 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

#### 참 고 문 헌

1. Abo-El-Dahab, M. K. and El-Goorani, M.A.: Phytopathology, 54 : 1285(1964)
2. Agrinos, G. N.: Plant Pathology, 2nd ed. Academic Press. New York and London(1978)
3. Aldrich, J. and Baker, R.: Plant Dis. Rep., 54 : 446 (1970)
4. Arthur, I. A., Backman, W. and Peter, D.: Microbiological Review, 50 : 1(1986)
5. Baker, K. F. and Cook, R. J.: The American Phytopathological Soc., St. Paul, Minnesota, p. 433, (1978)

6. Broadbent, P., Baker, K. F. and Holland, J.: Phytopathology, 67 : 1027(1977)
7. Chang, I-Pin. and Kommedahl, T.: Phytopathology, 58 : 1395(1968)
8. Chang, S. and Cohen, S. N.: Mol. Gen. Genet., 168 : 111(1979)
9. Collins, C. H. Lyne, P. M.: Microbiological Method. 5th ed. Butterworths(1984)
10. Henner, D. J.: Gene, 26 : 313(1983)
11. 加藤邦彦: Abstract of the Japanes Society of Soil Science and Plant Nutrition, 33 : 45(1987)
12. Keiko, N. and Imanaka, T.: Appl. and Environ. Microbiol., 55 : 320(1989)
13. Lamml, U. K.: Nature, 227 : 680(1970)
14. Meniatis, T., Fritsch, E. F.: J. Sambrook. Molecular Cloning Cold Spring Harbor Laboratory(1982)
15. Michio, H.: Soil and Microbiol., 32 : 25(1988)
16. Murray, R. G. E. *et al.*: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 8th ed. The Williams and Wilkins Co.(1984)
17. Olsen, C. M. and Baker, K. F.: Phytopathology, 58 : 79(1968)
18. Raymond, L. Rodriguez and Robert, C. Tait.: Recombinant DNA Techniques Addison-Wesley Publishing Company(1983)
19. Schnepf, H. E. and Cetus, Corp.: Proc. Nat. Acad. Soci., 78 : 2893(1981)
20. Shivakumar, A. G.: J. of Bacteriol., 166 : 194(1986)
21. 鈴木達言, 久保田 勝: 日本土壤肥料學會誌, 42 : 126 (1971)
22. Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H. G. Schlegel, H. G.: The Prokaryotes; A Handbook and Identification of Bacteria Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York(1981)
23. Suslow, T. V. and Schroth, M. M.: Phytopathology, 72 : 199(1982)
24. Swinburne, T. R., Barr, J. G. and Brown, A. F.: Trans. Br. Myco. Soc., 65 : 211(1975)

#### **Transfer of *Bacillus thuringiensis* toxin gene into *Bacillus subtilis* and its inoculation effects**

Young-Hwan Rhee, Kwang-Sik Kim, Yong-Woong Kim and Yeong-Yil Kim(Department of Agricultural Chemistry, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea)

**Abstract :** The antagonistic bacteria, showing distinguished effect against *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* were isolated from the rhizospheres of horticultural plants and identified as *Bacillus subtilis*. The strains were studied for their characteristics of biochemistry, physiology, antagonistic effect against plant pathogenic fungi, and growth promoting effect on horticultural plants. The *Bacillus thuringiensis*(BT) HD-1 toxin gene was introduced into these *B. subtilis*. The BT toxin genes on chromosome of the bacteria were identified by southern blotting, but its proteins were not detected by SDS-PAGE. These transformed bacteria showed growth promoting effect and showed also insecticidal and antagonistic effects against *Bombix mori* and fungi *F. oxysporum* and *R. solani* but not against nematode *Bursaphelenchus xylophilus*.