

## Electroporation에 의한 근권 미생물 *Pseudomonas fluorescens*의 형질전환

이영환\* · 김종현

전남대학교 농과대학 농화학과

**초록** : 식물 병원성 사상균 *F. oxysporum*과 *R. solani*에 대하여 우수한 길항력을 갖는 *Pseudomonas (P.) fluorescens*를 작물 근권으로부터 분리하여 생리, 생화학적 특성을 조사하였다. 이들 분리 근권길항 미생물중 한 균주인 Ps70과 plasmid pSV2-neo를 이용하여 electroporation에 의한 길항 미생물 *P. fluorescens*의 transformation 가능성과 최적 조건을 조사하였다. 그 결과 10% glycerol을 electroporation buffer로 사용하여 2.5 kV의 voltage, 200  $\Omega$ 의 resistance에서 최적의 electrotransformation 효과를 보였다. 또한, 이균주에 크기가 서로 다른 plasmid를 electroporation하여 transformation 효과를 비교한 결과 voltage, electroporation buffer의 조성, 그리고 resistance (time constant)가 transformation의 효과를 증진하는데 주요한 역할을 하는 것으로 나타났으며, 또 다른 *P. fluorescens* 균주에 같은 실험을 반복한 결과 유사한 electrotransformation 효과를 보였다(1995년 9월 4일 접수, 1995년 9월 29일 수리).

### 서 론

최근 유기 합성 농약 및 비료의 급격한 사용증가는 환경 오염 뿐 아니라 식물 병원성 사상균의 내성, 토양 생태계 파괴 그리고 토양 물리성의 약화 등의 문제를 야기 하였다. 이러한 문제점을 해결하고자 *Bacillus*속,<sup>1-3)</sup> *Pseudomonas*속,<sup>4)</sup> *Rhizobium*속,<sup>5)</sup> *Flavobacterium*속,<sup>6)</sup> *Agrobacterium*속<sup>7)</sup> 등의 세균과 *Penicillium*<sup>8)</sup> 등의 사상균, 그리고 *Streptomyces* 등의 방사선균등을 이용한 생물학적 방제 방법이 활발히 연구되어 왔다.<sup>9-12)</sup> 이들 길항 미생물 중 *Pseudomonas*속 균주는 작물의 초기 생육을 촉진할 뿐 아니라 pseudobactin, pyoverdine 같은 chelator와 pyocyanine, pyrrolnitrin 등의 항생물질을 생성하여 근권미생물 생태계를 조절하는 역할이 큰 것으로 알려져 있다.<sup>13,14)</sup>

한편, 유용한 외부 유전자를 미생물에 도입하여 형질전환을 하기 위해서는 우선 competent cell을 유도한 후, CaCl<sub>2</sub>를 이용한 방법,<sup>15)</sup> 원형질체를 형성한 후 PEG를 매개한 방법<sup>16)</sup>이나 원형질체 자체를 융합하는 방법,<sup>17)</sup> 수여체와 공여체의 미생물을 접합하는 방법<sup>18)</sup> 등이 쓰이고 있다.

길항미생물 *Pseudomonas*의 경우, 외부 유전자 도입 방법으로는 transduction이나 접합에 의한 방법이 알려져 있으나, 대부분의 미생물이 그렇듯이 competent cell 형성과 방법 자체에 상당한 어려움이 따른다. PEG를 이용한 형질전환이나 원형질체 융합은 영양 요구성 균주를, 접합을 이용한 방법의 경우는 항생제 내성 돌연변이를 유도하여 선발 marker로 이용하므로써 미생물이

갖는 고유의 유용한 특성의 손실을 감수 하여야 한다. 그러므로 본 연구는 근권길항미생물로 널리 알려진 *Pseudomonas*속 균주가 갖는 고유의 유용한 특성을 잃지 않고, 외부 유전자도입의 가능성을 제시하기 위하여, *Pseudomonas*속 균주를 분리하고 이 균주의 막에 electroporation 방법으로 pore를 형성한 후 유전자를 도입하여 electroporation의 최적조건을 조사하므로써 electroporation에 의한 *Pseudomonas*속 균주의 형질전환 가능성 여부를 검토하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### *Pseudomonas* spp.의 분리 및 동정

연작지의 작물 근권토양 1g을 0.01M Tris(pH 7.2) 100 ml로 15분간 진탕 배양 한 후 *Pseudomonas* 선발 배지인 King' B 한천 배지<sup>19)</sup>에 도말, 접종 한 후 30°C에서 24시간 배양 하여 형광성을 띤 *Pseudomonas* spp.를 선택적으로 선발 하였다. 선발된 균주는 LB/potato dextrose agar 배지 상에서 *F. oxysporum*, *R. solani* 등의 식물 병원성 사상균과 1cm간격으로 희석하여 대치 배양하고 이들 중 길항력이 우수한 균주를 최종 선발하여 The prokaryotes,<sup>19)</sup> Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,<sup>20)</sup> Microbiological Method<sup>21)</sup> 및 미생물학 실험서<sup>22)</sup>에 따라 생리, 생화학적 특성을 조사하였다. 균주는 필요에 따라 L액체배지(Bacto yeast extract 5g, Bacto tryptone 10g, NaCl 5g per liter)에 배양하고 glycerol을 최종농도가 20% (w/v)되도록 첨가하여 -70°C에 냉동 보관하며 사용하였다.

찾는말 : *P. fluorescens*, electrotransformation, electroporation, rhizobacteria

\*연락처

### Plasmid의 조제

Electroporation에는 5.8 kb의 pSV2-neo(ATCC37149), 13 kb의 pSUP2021<sup>23)</sup> 그리고 19 kb의 pSUPBTR<sup>18)</sup> plasmids가 사용되었다. 이들 각각의 plasmid는 *E. coli*를 숙주로 하여 CsCl-ethidium bromide 농도 구배 원심분리 방법<sup>15)</sup>으로 추출한 후 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA(pH 8.0) 용액으로 투석하여 ethanol로 침전하여 조제하였다. 침전된 plasmid는 T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>용액에 용해시켜 phenol로 정제한 후 ethanol로 재침전, 세척하고 적당한 양의 T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>용액에 녹여 농도를 측정하여 다음 electroporation에 사용하였다.

### Electroporation

Jonathan M. Diver<sup>24)</sup>와 Bio-Rad technical service의 방법<sup>25)</sup>을 변형하고 Bio-Rad의 Gene Pulser System을 이용하여 electroporation 하였다. 공시 균주를 L-액체배지에 접종하여 진탕 배양하고 OD<sub>600</sub>이 0.5~1.0일때 4000 Xg로 15분간 원심 분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체를 1 mM Hepes, pH 7.0 (10% glycerol의 경우에는 멸균수)로 현탁하고 원심분리하여 세척하는 과정을 2회 반복 한 후 electroporation buffer인 HGEB(1 mM Hepes, pH 7.0, 10% glycerol), SMEB(1 mM Hepes, pH 7.0, 300 mM sucrose, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) 또는 10% glycerol (v/v)용액 0.5~0.6 ml (10<sup>8</sup>~10<sup>10</sup> cfu/ml)에 현탁 하였다. 총 균체수를 계수 하는데 이 현탁액 100 μl를 사용하였으며, 또 다른 100 μl는 1.5 ml의 polypropylene tube에 옮기고 DNA 1~10 μg를 첨가하여 얼음 위에서 30~60초간 정치한 후 electroporation cuvette (0.2 cm electrode gap)에 옮겨 electroporation에 사용하였다. 이때 electroporation 조건 (최적 조건을 조사하는 실험은 제외)으로 voltage는 2.5 kV(12.5 kV/cm), discharge capacitor는 25 μF, 그리고 pulse controller parallel resistor는 200 (time constant의 기대값; 5 ms)로 하였다. electroporation 실험 즉시 900 μl의 SOC용액 (2% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glucose)을 cuvette에 가하고 조심스럽게



Fig. 1. Growth inhibition of *R. solani* by antagonistic bacteria *Pseudomonas* Ps70. (right) *R. solani* with *Pseudomonas* Ps70, (left) *R. solani* itself.

현탁하여 polypropylene tube에 옮기고 30°C에서 한시간 배양 한 후, 이 현탁액을 plasmid에 따라 알맞는 항생제가 첨가된 L-배지에 도말 하여 30°C에서 콜로니가 나타날 때까지 배양하였다. 여기에서 생성된 콜로니수를 총균체수와 비교하여 transformation efficiency (number of transformants/μg of DNA) 및 transformation frequency (%)를 계산 하였다.

### 결과 및 고찰

#### *P. fluorescens*의 분리 및 동정

작물 연작지 토양으로 부터 분리한 균주를 King'B 배지에 도말하여 형광성을 갖는 *Pseudomonas*속 균주만

Table 1. Biochemical and physiological characteristics of *P. fluorescens*.

Factor	Strain			
	Ps37	Ps40	Ps43	Ps70
Fluorescent				
King'A	-	-	-	-
King'B	+	+	+	+
Growth at				
41°C	-	-	-	-
4°C	+	+	+	+
Hydrolysis of				
Gelatin	-	-	-	+
Starch	-	-	-	-
Arginine hydrolysis	+/-	+/-	+/-	+
Catalase	+	+	+	+
Lecithinase	-	-	-	+
Lipase	ND	ND	ND	+
Oxidase	+	+	+	+
Urase	-	-	-	-
Denitrification	-	-	-	+
Utilization of				
Alanine	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+
Butyric acid	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+
Glutamate	+	+	+	+
Glycine	+	+	+	+
Hippurate	+	+	+	-
m-Inocitol	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+
Oxalate	+	+	+	+
Propionate	-	-	-	-
Propylene glycol	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+
Succinate	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+

\*ND : not detected.

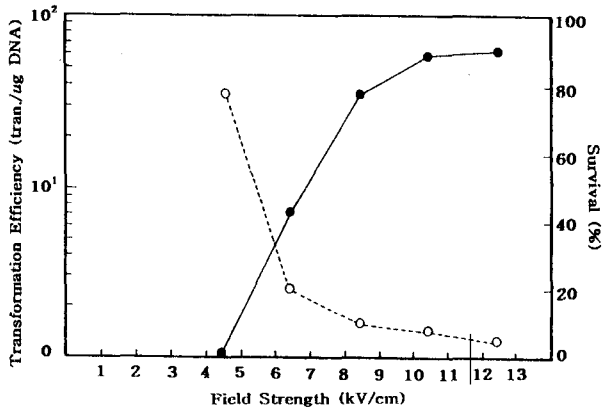


Fig. 2. Effect of variation in field strength on transformation efficiency (●—●) and post-pulse cell survival (○—○) of Ps70 with plasmid pSV2-neo in HGEb. Discharge capacitor setting, 25  $\mu$ F; parallel resistor setting on Pulse Controller, 200 $\Omega$ .

을 선택적으로 분리하고 식물 병원성 사상균인 *F. oxysporum*, *R. solani*와 1 cm간격으로 획선하여 대치 배양한 후 형성된 저지대 폭을 측정하여(그림 1) 길항력이 가장 우수한 균주를 최종 선발하여 Ps37, Ps40, Ps43, Ps70 이라 명명하고 생리, 생화학적 특성을 조사하였다. 그 결과 각 균주 *P. fluorescens*로 동정 되었으며 표 1과 같이 몇가지 조사에서 각 균주간의 차이가 발견 되었다. Lecithinase, 탈질 작용, gelatin 가수분해의 경우 Ps37, Ps40, Ps43는 음성인데 반해 Ps70은 양성으로 나타났으며, hippurate 이용성은 Ps37, Ps40, Ps43은 양성으로, Ps70은 음성으로 판명 되었다. 그 이외의 성질은 네 균주 모두 동일하였다.

#### *Pseudomonas* Ps70을 이용한 Electroporation의 최적조건

Ps70균주와 plasmid pSV2-neo를 이용하여 우선 몇가지 조건에서 electroporation의 최적조건을 조사하였다. *P. fluorescens*에 있어서 discharge capacitor의 변화가 electrotransformation에 미치는 영향에 대하여 알려진 바가 거의 없기 때문에 본 연구의 모든 실험에서는 discharge capacitor를 25  $\mu$ F로 사용 하였다. Voltage에 의한 transformation 효과를 조사하기 위해서는 pulse controller는 200  $\Omega$ 으로 고정하고 voltage는 0.9~2.5 kV (4.5~12.5 kV/cm)로 변화 시켜 electroporation 하였다. 그 결과 그림 2에서 보는 바와 같이 voltage가 증가 할수록 transformation의 효과 또한 증가 하였으나 균주의 생존율은 약 3%까지 급격히 감소 하였다. 한편, 4.5 kV/cm이하의 voltage에서는 transformation이 일어나지 않았으나 약 20% 정도의 균주 치사율을 보임에 따라 균주의 생존율이 voltage 변화에 매우 민감한 것으로 생각된다. 가장 높은 transformation의 효과를 나타내는 12.5 kV/cm에서 균주의 생존율은 5% 이었다. 따라서 본 실험에 쓰인 Ps70의 electroporation에 있어서의 최적 voltage는 12.5 kV/cm로 나타남에 따라 이후 실행되는 모든 electrotransformation

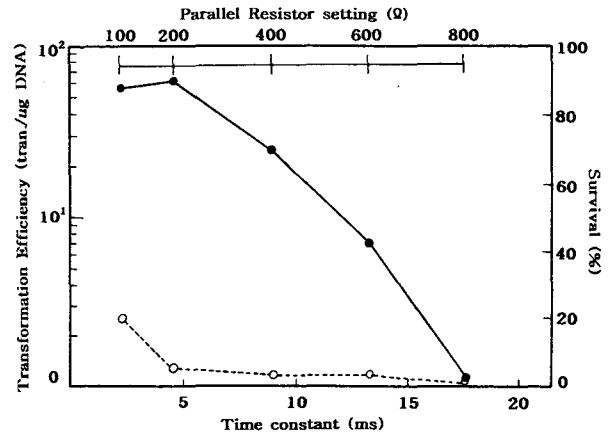


Fig. 3. Effect of variation of time constant on transformation efficiency (●—●) and post-pulse cell survival (○—○) of Ps70 with plasmid pSV2-neo in HGEb. Discharge capacitor setting, 25  $\mu$ F; field strength, 12.5 kV/cm(2.5 kV applied voltage).

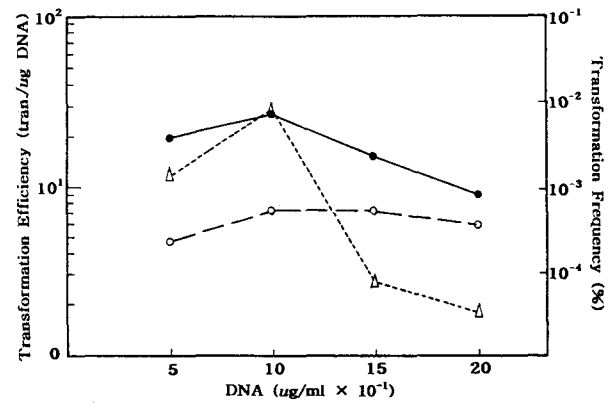


Fig. 4. Effect of variation in sample DNA concentration on transformation efficiency(●—●) and transformation frequency( $\Delta$ — $\Delta$ ) of Ps70 with plasmid pSV2-neo and transformation efficiency with plasmid pSUPBTR(○—○) in HGEb. Discharge capacitor setting, 25  $\mu$ F; parallel resistor setting on Pulse Controller, 200 $\Omega$ ; field strength, 12.5 kV/cm(2.5 kV applied voltage).

tion은 12.5 kV/cm의 조건하에서 실시 하였다.

다음으로 시료에 흐르는 전류의 time constant에 따른 electrotransformation의 효과를 조사하기 위하여 pulse controller의 resistor를 조정하였다. 조사 결과 voltage와 resistor의 변화에 따른 time constant값은 기대값<sup>25)</sup>보다 약간 낮게 나타났으며 그림 3에서 보는 바와같이 time constant값이 9 ms 이상에서는 균주 생존을 뿐아니라 transformation의 효과도 급격히 저하 되었다. time constant값이 클수록 균주 생존을 및 transformation의 효과는 감소 하였고 time constant값이 2.3~5 ms 사이에서는 비교적 높은 transformation이 일어 났으며 균주 생존율은 20~5% 정도 유지되었다. 그리고 약 5 ms의 time constant값을 보인 resistor 200  $\Omega$ 에서 가장 높은 transformation의 효과를 보인 것으로 조사 되었다. 또한 DNA양에 따른 transformation의 효과를 조사하고자 100

Table 2. Influence of electroporation buffer composition on transformation of *P. fluorescens* Ps70 with each plasmid.

Buffer	Time Constant (ms)	plasmid (Transformants/10 µg DNA)		
		pSV2-neo	pSUP2021	pSUPBTR
10% Glycerol	4.7	3.9×10 <sup>2</sup>	1.28×10 <sup>3</sup>	1.35×10 <sup>2</sup>
HGEB	4.8	3.8×10 <sup>2</sup>	7.53×10 <sup>2</sup>	5.0×10 <sup>1</sup>
SMEB	3.9	1.3×10 <sup>2</sup>	3.63×10 <sup>2</sup>	2.5×10 <sup>1</sup>

µ의 균주 현탁액에 농도를 다르게 5~20 µg의 pSV2-neo plasmid DNA를 가하여 electroporation 하였다. 그 결과 그림 4에서 처럼 100 µl의 균주 현탁액에 5~10 µg의 DNA가 첨가 되었을 때 transformation의 효과는 증가 하였으나 그 이상의 DNA 농도에서는 감소 하는 것으로 관찰 되었다. 대부분의 경우에서 DNA 농도의 증가는 transformation의 효과를 증가 시킨다는 보고<sup>25)</sup>가 있으나 본 연구에서는 상반된 결과를 보여, 균주 현탁액에 첨가되는 DNA가 용해된 TE buffer의 증가가 electroporation buffer의 이온 강도 변화를 초래하는게 아닌가 추정 된다. 따라서 추후, TE buffer의 양을 일정하게 유지하고 DNA 농도만을 증가시켜 DNA 농도에 따른 transformation 효과 측정이 이루어져야 할 것으로 생각된다. Pulse 후 DNA 농도에 따른 생존균수에 대한 transformation frequency (transformants/생존균주)는 transformation efficiency와 비슷한 경향을 보였다. 또한, 동일한 조건으로 pSUPBTR을 Ps70에 electroporation하였을 경우에도 pSV2-neo와 유사한 결과를 보였다.

#### Electroporation Buffer와 균주에 따른 Electroporation의 효과

Plasmid의 크기와 electroporation buffer의 종류가 electroporation의 효과에 미치는 영향을 검토하기 위하여 크기가 각각 틀린 세 종류의 plasmids pSV2-neo (5.8 kb), pSUP2021 (13.0 kb), pSUPBTR (19.0 kb)와 세 종류의 buffer 10% glycerol, HGEB, SMEB를 사용하여 transformation의 효과를 비교 하였다. 표 2에서 나타낸 바와 같이 전체적으로 10% glycerol을 사용 했을 경우 HGEB buffer 보다 높은 효과를 보였으며, 다음으로 SMEB의 순이었다. 그리고 plasmid 종류에 따라서는 13.0 kb의 pSUP2021에서 가장 높은 효과를 보였다. 10% glycerol과 HGEB의 time constant는 resistor 200 Ω에서 4.7±0.1이었으며, 균주 생존을 또한 두 buffer에서 유사 하였다. 반면, 같은 조건에서 SMEB의 경우 time constant는 3.9로 나타났으며 균주 생존을 또한 10% glycerol이나 HGEB 보다 높게 나타났다. 이것은 SMEB의 1 mM MgCl<sub>2</sub>가 buffer의 전기 전도성을 향상 시킨 때문인 것으로 생각 된다. 따라서 electroporation에 의한 transformation은 DNA의 size에 크게 영향을 받지 않는 것으로 생각 되며, 높은 균주 생존율과 transformation의 효과는 직접적인 연관이 없는 것으로 생각된다. 위의 방법에 의해 조사된 최적 조건(200 Ω resistance, 25 µF capacitance, 그리고 2.5 kV

Table 3. Transformation of strains of *P. fluorescens* with plasmid pSV2-neo in HGEB.

Transformation efficiency (transformants/10 µg DNA)	Strains			
	Ps37	Ps40	Ps43	Ps70
	5.4×10 <sup>2</sup>	7.4×10 <sup>2</sup>	4.8×10 <sup>2</sup>	3.8×10 <sup>2</sup>

voltage)으로 균주 Ps37, Ps40, Ps43에 HGEB buffer, plasmid pSV2-neo를 사용하여 electroporation 후 transformation의 효과를 비교 하였다. 그 결과는 표 3에서 보는바와 같이 모든 균주가 Ps70 보다 높은 transformant를 형성 하였으며, Ps40의 경우 약 2배 정도 높게 나타났다. 이로서 미생물의 종류에 따라 transformation 효과가 다양하다는 것을 알 수 있으며 근권길항 미생물인 *P. fluorescens*의 형질전환에 있어서 항생제 내성 돌연변이를 유발하여야 하는 고전적인 접합에 의한 방법보다는 미생물이 갖는 고유의 유용한 특성을 잃지 않는 electroporation에 의해 외부 유전자의 도입이 가능하다고 생각 된다.

#### 참 고 문 헌

- Kim, K. S., Y. W. Kim, J. W. Park and Y. Y. Kim (1993) Studies on the use of microbial formulations for growth and yield of horticulture crops. RDA. *J. Agri. Sci(Agri. Inst. Cooperation)*. **35**, 129-140.
- Phae, C. G., M. Shoda. and H. Kubota (1990) Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its ducts on phytopathogenic microorganisms. *J. Ferment. Bioeng.* **69**, 1-7.
- Turner, J. T. and P. A. Backman (1991) Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant Disease* **75**, 347-353.
- Kraus, J. and J. E. Loper (1992) Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. *Phytopathology* **82**, 264-271.
- Cook, R. J., D. M. Weller and L. S. Thomashow (1987) Enhancement of root health and plant growth by rhizobacteria. Molecular strategies for crop protection. Alan Liss Inc. p125-134.
- Cook, R. J. (1984) Biological control of root pathogens: New technologies and potential for impact on crop productivity. *Soilborne Crop Disease in Asia*. FFTC, Taiwan. pp 206-214.
- Pesenti-Barili, B., E. Ferdani, M. Mosti and F. Degli-Innosenti (1991) Survival of *Agrobacterium radiobacter* K84 on various for crown gall control. *Appl. Environ. Microbiology* **57** (7), 2047-51.
- Cook, R. J. (1985) Biological control of plant pathogens: Theory to application. *Phytopathology* **75**(1), 25-29.
- Cook, R. J. and K. F. Baker (1983) The nature and practice of biological control of plant pathogens. The APS Press, p262.
- Grenier, D and A. Asselin (1990) Some pathogenesis-related proteins are chitosanase with lytic activity against fungal

13. Schipper, B., B. Lugtenburg and P. J. Weibek (1987) Plant growth control by *fluorescent* *Pseudomonas*. Innovative approaches to plant disease control, John Wiley and Son, New York. p19-40.
14. Suslow, T. V. (1982) Role of root colonization bacteria in plant growth. Phytopathogenic prokaryotes, Academic Press. New York. p187-224.
15. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook (1989) Molecular cloning; A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
16. Chang, S. and S. N. Cohen (1979) High Frequency Transformation of *Bacillus subtilis* Protoplasts by Plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* **168**, 111-115.
17. Takahashi, A. and S. Junichi (1981) Studies on regeneration media for *Bacillus subtilis* protoplast. *Agric. Biol. Chem.* **45** (12), 2887-2894.
18. 김영일, 이영환, 강훈수 (1992) Expression of *Bacillus thuringiensis* HD-1 gene in rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* KR164. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **35**(4), 227-231.
19. Starr, M. P., H. Stolp., H. G. Truper and H. G. Schlegel (1981) The prokaryotes; A Handbook and identification of spores. *Molecular plant-microbe interactions* **3**(6), 401-407.
11. Henis, Y. and M. Inbar (1968) Effect of *Bacillus subtilis* on growth and sclerotium formation by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* **58**, 933.
12. 鄭永倫, 吳承煥 (1981) 土壤病害의 生物學的 防除研究. 人蔘研究 報告書 pp 56.
20. Krieg, N. R., J. C. Holt (1984) Bergey's manual of systematic bacteriology, Willams & Wilkins, Baltimore.
21. Collins, C. H. and P. M. Lyne (1984) Microbiological methods. 5th ed. Butterworths.
22. 韓國 微生物 學會編. 微生物 學實驗 (1987) 아카데미서적.
23. Simon R., U. Priefer and A. Puhler (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**, 784-791.
24. Jonathan, M. D., E. B., Larry and A. S. Pamela (1990) Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by Electroporation. *Analytical Biochemistry.* **189**, 75-79.
25. Bio-Rad Technical Service. Pulse Controller Instruction Manual. Catalog Number 165-2098.

#### Transformation of Rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* by Electroporation

Young Hwan Rhee\* and Jong Hyun Kim (Department of Agricultural chemistry, Chon-nam National University Kwang-Ju 500-757, Korea)

**Abstract**: The antagonistic rhizobacteria, *Pseudomonas(P.) fluorescens* against *F. oxysporum* and *R. solani* were isolated and selected, and then, their biological and physiological characteristics were investigated. The possibility and optimum condition of the electroporation of antagonistic rhizobacteria with Ps70, one of the selected one, and plasmid pSV2-neo was studied. Its optimum condition was found with HGEB which contains 1 mM (pH 7.0) hepes and 10% glycerol at setting of 200 resistance, 25  $\mu$ F capacitance, and 2.5 kV applied voltage. In addition, the transformation efficiency obtained with pSV2-neo was compared to other plasmids with different sizes. The applied voltage, the buffer composition and the parallel resistor (time constant) were shown to have the greatest effect on transformation efficiency in electroporation. And the rest of the selected rhizobacteria were also successfully transformed with pSV2-neo by electroporation.

\*Corresponding author