

## *Phytophthora capsici*의 성장을 저해하는 *Enterobacter* sp. B54의 선발과 Tn5 lac을 이용한 돌연변이 유기

윤상홍\* · 최 침<sup>1</sup>

\*농업과학기술원 분자유전과, <sup>1</sup>영남대학교 식품가공학과

**Tn5 lac Mediated Mutagenesis of *Enterobacter* sp. B54 Antagonistic to *Phytophthora capsici*. Yoon, Sang-Hong\* and Chung Choi<sup>1</sup>.** Department of Molecular Genetics, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Suwon 441-707, Korea, <sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Yeung Nam University, Gyongsan 712-749, Korea - *Enterobacter* sp. B54 which shows antagonistic activity to *Phytophthora capsici* on potato dextrose agar was selected among 112 strains isolated from Korean soil. After Tn5 lac-induced mutants were obtained through P1::Tn5 lac mutagenesis, 2 mutants for loss of antibiosis and 1 mutant for increased antibiosis were screened by using *in vitro* fungal inhibition assay. When the 3 mutants affected in antibiosis were analyzed by southern hybridization with pRZ102 (ColEI::Tn5) as a probe, its results suggest that Tn5 lac was randomly inserted into different chromosomal sites in these mutants.

**Key words:** *Enterobacter*, antagonistic bacteria, Tn5 lac mutagenesis, *in vitro* fungal inhibition assay

항곰팡이성 물질 생성에 의해 식물병원성 곰팡이의 성장을 저해하는 길항균은 다양한 세균에서 관찰되어지고 있으며 이들의 유전자를 분석하고자 하는 시도는 그것의 넓은 응용잠재력에 비추어 볼 때 비교적 늦은 80년대 중반 무렵에 비로소 활발해졌다. 이것은 어떠한 항생제의 생합성에 관련하는 효소들이나 최종산물에 대한 정보가 전혀 없을 경우에도 DNA 사이에 무작위로 삽입하여 극성돌연변이를 유발하는 transposon을 재조합한 vector들이 연이어 개발됨으로 가능해진 것이다[1, 7, 9]. 특히 Tn5가 미지의 유전자를 표현형만으로 선발할 수 있는 강력한 도구로 이용된 것은 대개 무작위로 그람음성 세균의 염색체나 plasmid에 삽입되어 인접한 유전자의 발현을 저해하는 특성때문이다. 이러한 transposon vector를 이용하여 미생물로부터 식물병원성 유전자, 질소고정유전자, 중앙유기유전자 등의 cloning이 이미 성공적으로 수행된 바 있다[2, 8, 9]. 따라서 길항력을 상실한 transposon 돌연변이주로부터 목표유전자를 cloning하는 것은 기존의 방법들에 비해 명확하고 용이할 수 있다.

본 실험에선 고추 역병균(*Phytophthora capsici*)의 성장을 저해하는 길항균을 한국 토양으로부터 분리 동정하였고 P1::Tn5 lac에 의해 돌연변이를 유기하여 길항력이 강화된 변이주와 상실된 변이주를 선발 및 확인하였기에 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

\*Corresponding author  
Tel. 82-331-290-0376, Fax. 82-331-290-0392

### 배지 및 사용시약

*E. coli* SKB 2692(SF800 Pl::Tn5 lac)와 *Enterobacter* sp. 54의 배양과 증식에 사용된 배지는 Luria-Bertani 배지(1% trypton, 0.5% yeast extract, 1% NaCl)를 사용했으며 고추역병균(*Phytophthora capsici*)와 오이입고병균(*Pythium ultimum*)의 계대 및 생물검정을 위해 potato dextrose agar 배지를 사용하였다. *E. coli* SKB 2692는 37°C, *Enterobacter* sp. B54는 28°C에서 배양하였다. 기타 유전자 조작에 관련된 시약은 Bohringer Menheim사와 Promega사 제품을,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP는 Amersham사 제품을 사용하였다.

### 균주 및 plasmid

본 실험에 사용된 균주 및 plasmid는 Table 1에서 보는 바와 같다.

### 길항균의 선발 및 동정

수원근교의 역병으로 감염된 고추재배지의 식물근권으로부터 뿌리와 토양을 함께 2g씩 채취하여 멸균된 0.8% 식염수 100 ml에 현탁하여 실온에서 이틀간 진탕한 다음 Whatman No.1 여지로 여과한 액을 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>으로 각각 희석하여 ampicillin이 50 µg/ml 되게 함유된 LB 한천배지상에 도말하였다. 여기서 자란 세균 집락을 대상으로 *Phytophthora capsici*와 *Rhizoctonia solani*에 대한 길항력검정을 하였고 길항력이 나타난 집락은 다시 kanamycin, chloramphenicol, tetracyclin 및 streptomycin에 대한 내성을 조사하였다. 선발된 길항균은

Table 1. Microorganism and plasmid used in this study

Strains & plasmids	Genetic Characteristics	Reference
<i>Escherichia coli</i>		
SKB2692	SF800 (P1::Tn5 lac)	Univ. of Stanford
MC1061	<i>hadR.haaM<sup>r</sup>, araDB9Δ(ara-leu), 7679Δ(lac), λ74galU, galK, rpsL</i> (str <sup>r</sup> )	RDA collection
<i>Enterobacter</i> sp. B54	Antagonistic bacterium to <i>Phytophthora capsici</i>	Isolated from soil
M54-47	Tn5 lac mutant with strengthened antifungal activities	This study
M54-113	Tn5 lac mutant lost antifungal activities	This study
M54-329	Tn5 lac mutant lost antifungal activities	This study
<i>Phytophthora capsici</i>	Phytopathogenic fungus causing <i>Phytophthora</i> blight in red-pepper	RDA collection
pRZ102	ColEI::Tn5	RDA collection

Gram음성용 API 20E kit로 생화학적 특성을 조사하여 간이 동정하였다.

#### Pl::Tn5 lac의 분리 및 transduction

Pl::Tn5 lac의 분리는 Kroose 등의 방법에 준해 행하였는데 사전 확인된 *E. coli* SKB2692 균주를 20 µl의 LB/Cat, Km배지에 접종후 30°C에서 하룻밤 배양한다 [6]. 최종농도가 10 mM되게 MgSO<sub>4</sub>를 첨가한 1 l의 LB/Cat, Km 액체배지에 사전 배양된 20 µl을 접종하여 30°C에서 2.5시간 가량(Klett, 30 units) 배양시킨 후 42°C에서 35분간 진탕하면 숙주세포가 완전히 용균되면서 P1::Tn5 lac이 유리되어 세포 밖으로 나온다. 이 배양액을 4°C에서 6000×g로 10분간 원심분리하여 균체를 가라앉히고 4°C에서 그 상등액 400 ml당 48 g의 polyethylenglycol 6000과 14 g의 NaCl을 부가하여 서서히 혼합하면서 용해시켰다. 1시간이 지난 후 4°C에서 5000×g로 15분 동안 원심분리하여 원심분리관 벽면에 퍼져 있는 phage 침전물의 잔액을 완전히 제거하고 8 ml의 TM완충액(10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris, pH 7.5)에 현탁하여 chloroform 몇 방울을 떨어뜨린 뒤 4°C에서 보관하였다. *Enterobacter* sp. B54를 5×10<sup>8</sup> cells/ml되게 배양시킨 뒤 균체를 침전하여 5 mM CaCl<sub>2</sub>가 함유된 LB배지 1 ml에 현탁시킨 뒤, 농축된 phage 40 µl를 첨가하여 37°C에서 2시간 진탕배양하였다. 이 배양액을 LB/Km (30 µg/ml)에 200 µl씩 도달한 후 30°C에서 하루밤 배양하여 자란 colony를 돌연변이주로 선발하였다.

#### Tn5 lac 돌연변이주의 길항력검정

Tn5 lac에 의한 돌연변이주의 길항력 검정은 대치배양법으로 행하였다. 사전배양된 식물병원균의 말단균사 부분을 멸균된 칼로 정사각형으로 잘라(0.5×0.5 cm) 새로운 PDA 배지 중앙에 접종하고 28°C에서 2일간 배양하였다. 최말단 균사로 부터 1.5 cm 간격으로 돌연변이주를 접종하여 24시간 뒤 균사의 생육 저지대를 측정하고 야생균주와 대조하여 길항력이 변화된 균주를 선발하였다.

#### Chromosomal DNA의 분리

*Enterobacter* sp. B54 균주를 15 ml의 LB에 접종하여 28°C에서 24시간, 150 rpm으로 진탕배양하였다. 이들을 5000×g에서 10분간 원심분리하여 집적된 균체를 8 ml의 SET완충액(50 mM Sucrose, 10 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8.0)에 현탁하고 20 µl의 lysozyme(10 mg/ml) 용액을 부가하여 실온에서 20분간 반응시켰다. 10% SDS 500 µl를 첨가하여 천천히 혼합하면 현탁액이 맑아지면서 점성이 높아지는데 이것을 50°C에서 10분간 반응한 뒤 RNase(10 mg/ml)용액 400 µl를 첨가하여 37°C에서 반응시키고 0.5M EDTA를 500 µl부가, 혼합하여 50°C에서 10분간 처리하였다. 여기서 단백질을 제거하기 위해 proteinase K(20 mg/ml)용액을 75 µl 부가한 뒤 37°C에서 2시간 동안 조심스럽게 흔든다. 이 용액에 phenol을 동량 부가하고 10분동안 천천히 실온에서 상하로 혼합한 액을 두세차례 원심분리(8000×g, 50분)하여 상층을 회수하였다. chloroform:isoamylalcohol(24:1, v/v) 혼합액을 동량 첨가하여 역시 실온에서 상하로 10분간 서서히 흔들어 주고 원심분리(8000×g, 50분)하여 상층을 회수하는 과정을 두차례 반복하여 96% 냉 ethanol을 2배 넣어주고 잘 흔들어서 미세유리관으로 DNA를 건져낸다. 회수된 DNA는 몇방울의 70% ethanol로 세척한 뒤 100 µl TE buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7.5)로 녹인 뒤, UV 분광 광도계로 순도(O.D. 260 nm/O.D. 280 nm)를 측정하고 정량하여 -20°C에서 보관하였다.

#### Southern hybridization에 의한 Tn5 lac 삽입 확인

분리된 길항력 상실 혹은 강화 변이주의 염색체 DNA를 EcoR1으로 절단하여 0.6% agarose gel 상에서 20 V로 하루밤 전기영동하였다. transilluminator상에서 DNA 단편들의 절단을 확인한 다음, DNA blotter(Hoeffer사)로 약한 감압하에서 이전용액(0.4N NaOH, 0.6N NaCl)을 gel상에 부우면서 1시간가량 nytran막에 DNA 단편을 이전시킨다. DNA단편이 이전된 Nytran막은 nick translation kit에 의해 α-<sup>32</sup>P dCTP로 표식된 pRZ102

(ColE1::Tn5)를 probe로 Southern의 방법에 준해 hybridization을 행하였다.

**길항저해의 현미경 관찰**

멸균된 slide glass(2.5×7.5 cm) 위에 PDA배지를 얇게 분주한 뒤 사전 배양된 *Phytophthora capsici*의 말단 부위를 잘라(2×2 mm) 한쪽 부근에 접종하여 28℃에서 하루 배양하였다. 다음날 맞은 편에 *Enterobacter* sp. B54를 접종하여 다시 하루 배양한 다음 저지된 말단균사의 형태적 변화를 현미경(×40)으로 관찰하였다.

**결과 및 고찰**

**길항균의 선발 및 생리적 특성**

수원 인근 고추재배지의 근권 토양으로부터 ampicillin(50 µg/ml)에 내성이 있는 112주의 균주들을 분리하였고 이들중 Tn5 유도체가 가진 항생제 저항성을 선발 표식인자로 사용하기 위해 kanamycin(50 µg/ml) tetracyclin(12.5 µg/ml), chloramphenicol(25 µg/ml), streptomycin(25 µg/ml) 등에 대한 항생제 내성검정을 행하여 kanamycin에 감수성이 있는 균주 67주, tetracyclin에 감수성이 있는 균주 46주를 선발하였다. 이들 균주들중 길항력이 있는 14주를 대상으로 *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*에 대한 길항력 유무를 검정한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 이중 Tn5 돌연변이가 유기되는 균주는 B54외에는

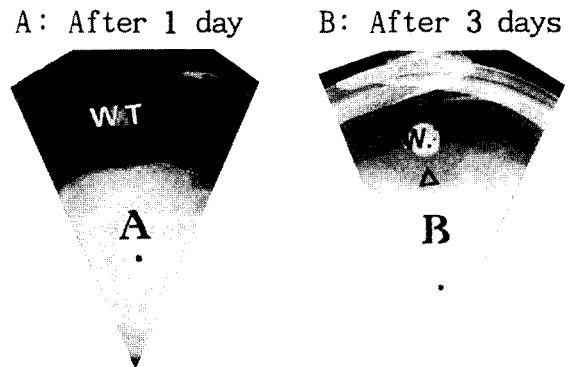
없었다(미공개 자료). 또한 B54 균주는 *P. capsici*에 한정되어 있으므로 관여 항생제도 수가 적을 것이므로 그에 관여하는 유전자의 분리도 용이할 것으로 예상된다. 따라서 이 균주를 본 실험의 공시균주로 사용하였다. PDA 배지상에서 *P. capsici*에 대한 B54의 생육저해는 균 접종후 3일이 지나면 뚜렷이 약화되면서 병원균의 2차균사가 자라나왔다(Fig. 1). B54의 이러한 제어양상은 원 인되는 활성물질이 매우 불안정한 구조를 가지거나 혹은 이것의 배지내 축적이 feed back inhibition에 의해 이 물질의 생성이 조절받는 것으로 추정된다. B54에 의해 저해받는 *P. capsici*의 균사말단 부분은 길항력이 상실된 변이주와는 달리 분홍색을 띄게되는데 이것은 길항물질과 곰팡이 대사산물이 반응한 산물의 색으로 생각된다.

한편 B54는 식물병원성 곰팡이들에 대한 길항효과가 *P. capsici*와 같은 일부 곰팡이에만 한정되어 있기 때문에 그것이 생성하는 항곰팡이성 물질의 종류와 양이 적을 가능

**Table 2. Antibiotic resistant assay and selection of bacteria antagonistic against *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum***

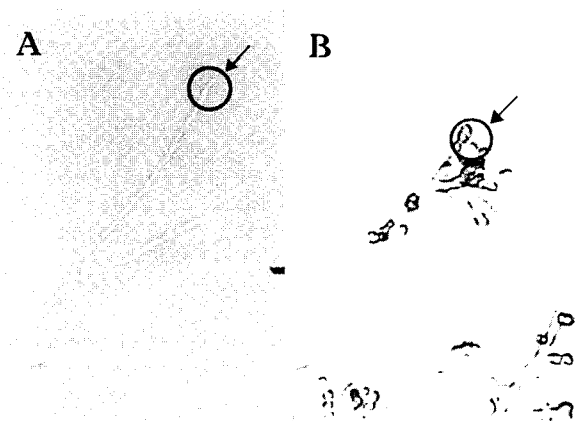
No. of bacteria	Antibiotic resistant assay*					Antagonistic spectrum		
	Amp	Km	Tet	Cat	Sm	<i>P.c</i>	<i>R.s</i>	<i>F.o</i>
B11	+	-	-	+	-	+	-	+
B12	+	+	-	+	-	+	-	-
B21	+	-	-	+	+	+	-	+
B33	+	-	-	-	+	+	-	-
B38	+	-	+	+	+	-	+	-
B47	+	-	-	+	+	+	+	+
B49	+	-	-	+	+	+	-	-
B50	+	-	-	+	+	+	-	-
B51	+	-	-	-	-	+	-	-
B54	+	-	-	-	-	+	-	-
B67	+	-	-	-	-	+	+	+
B81	+	+	-	-	+	+	-	+
B102	+	+	-	-	-	+	-	+
B109	+	-	+	+	+	+	-	-

\*Concentration of antibiotics; ampicillin (50 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml), tetracyclin (12.5 µg/ml), chloramphenicol (35 µg/ml), streptomycin (25 µg/ml).



**Fig. 1. Antagonistic assay of wild type *Enterobacter* sp. B54 against *Phytophthora capsici* after 1 day and 3 days of incubation on potato dextrose agar.**

A: After 1 day of antagonistic assay, B: After 3 days of antagonistic assay.



**Fig. 2. Fungal morphological abnormalities induced by *Enterobacter* sp. B54.**

A: Normal hyphae of *Phytophthora capsici*, B: Abnormal branching and swelling of *Phytophthora capsici*.

성이 높다. 따라서 원인물질의 생합성에 관여하는 유전자의 수와 크기도 적을 것이므로 순수한 길항유전자의 분리와 다른 미생물내 발현이 의외로 용이할 것이 예상된다.

**길항균의 생화학적 특성 및 균사의 저해양상**

*Phytophthora capsici*에 대한 이 균의 저해양상을 광학현미경으로 관찰한 결과 저해받는 병원균의 균사 말단부가 포도송이처럼 branching과 swelling이 동시에 일어났다(Fig. 2). 이것은 방선균 AM630에서 분리한 fosfazinomycin이 *Mucor racemosus*에 대해 저해하는 양상과 유사하였다[3]. 선발된 B54를 동정하기 위해 API 20E kit를 사용하여 생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 이것을 종합하여 분류하였을 때 *Enterobacteriaceae*속인 것으로 나타났다. Bergey's manual에 의하면 *Enterobacteriaceae*의 2군은 Voges-Proskauer (VP)와  $\beta$ -galactosidase(ONPG) 반응들에 양성을 보여주는 특성을 가지면서 lipase와 DNase에서는 음성을 나타내는 것으로 알려져 있다. ADH, ODC, LDC 반응에 음성을 보이는 것으로 보아 *E. cloacae*와 *E. sakazaki*일 확률은 희박하며 urease 반응이 음성이기 때문에 *E. gergoviae*일 확률도 배제되었다. 탄소와 에너지원으로서 glucose와 mannitol을 이용하는 것으로 보아 *E. aerogenes*는 아닌것 같으며, Table 3의 결과를 토대로 가장 유력한 종은 *E. agglomerans*인 것으로 추정되나 자세한 동정이 계속되어야 할 것으로 생각된다.

**Tn5 lac 돌연변이 유기 및 길항력 변이주의 선발**

*Enterobacter* sp. B54(Amp<sup>r</sup>)의 염색체내로 Tn5(Km)나 Tn5-132(Tet)의 삽입을 유도하기위해 *E. coli* NC 9370(pPHIJI::mu::Tn5)이나 *E. coli* NC9762(pRK2013::Tn5-132, pBEE132)를 공여주로 filter mating하여

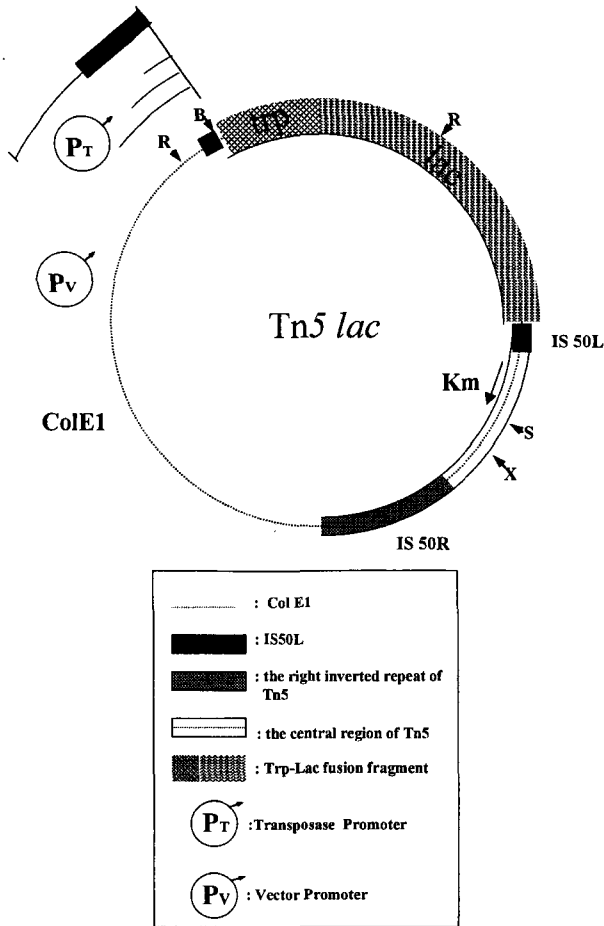
LB/Tet나 LB/Amp에서 선발한 결과 NC9370×B54처리에서는 어떠한 transconjugants들도 자라지 않았는데 이것은 NC9370에 존재하는 Mu phage가 *E. coli*와 매우 가까운 속인 *Enterobacter* sp. B54에도 치사현상을 유발하는데 기인할 수 있다. NC9762×B54의 mating 실험에서는 LB/Amp, Tet 배지에서 자라난 transconjugants들을 얻을 수 있었는데 이들의 전체 DNA를 분리한 결과 pBEE132의 Tn5가 염색체 내로 뛰어 들지 않고 세포내에서 존속 유지되고 있었기 때문에 Tn5돌연변이 유발을 위한 운반체로 사용할 수 없었다. 이것은 수용균주인 B54가 *E. coli*와 유전계통상 매우 가까운 *Enterobacter*일 가능성이 매우 높다는 것을 보여주는 또 하나의 증거이기도 하다. 위에서 언급한 문제점을 피하기 위해 phage를 이용한 Tn5돌연변이를 모색하였는데 본 실험에선 Stanford대학의 Kroos로부터 P1:Tn5 lac을 분양받아 사용하였다.

P1::Tn5 lac의 제작은 Tn5의 왼쪽 inverted repeat sequence(IS50L)의 일부를 제거한 후 promoter가 없는 *trp-lac* 융합유전자를 붙여서 Tn5 외곽부의 promoter를 이용하여 lacZ유전자를 발현하게끔 고안되었다. 그리고 Tn5 좌측말단부로부터 187base의 BamHI위치에서 Bal31 exonuclease에 의해 시계 역방향으로 60-90base까지 제거하여 전위기능에 영향을 주지않고 transposase promoter를 제거한 다음 *trp-lac*의 융합 단편을 붙인 것으로 이를 P1 phage에 연결시켜 만든 운반체인데 이 vector에 의해 Tn5 lac이 삽입된 변이주들은 kanamycin에 저항성을 보임과 동시에 X-gal과 IPTG를 첨가하였을 때 청색군락을 형성하기 때문에 쉽게 선발할 수 있는 잇점이 있다(Fig. 3).

그러나 본 실험의 공시균주인 *Enterobacter* sp. B54는 lactose 분해능을 가지고 있으므로 X-gal 첨가 배지가 아니라 kanamycin이 함유된 배지에서 선발할 수 있었다.

**Table 3. Biochemical test of *Enterobacter* sp. B54 by API 20E kits**

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL
+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	
+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
*ONPG : $\beta$ -galactosidase					ADH : arginine dihydrolase					
LDC : $\beta$ -lysine decarboxylase					ODC : ornithine decarboxylase					
CIT : citrate utilization					H <sub>2</sub> S : H <sub>2</sub> S production					
URE : urease					TDA : tryptophane desaminase					
IND : indol production					VP : acetoin production					
GEL : gelatinase					GLU : glucose fermentation/oxidation					
MAN : mannitol fermentation/oxidation					SAC : sucrose fermentation/oxidation					
INO : inositol fermentation/oxidation					MEL : melibiose fermentation/oxidation					
SOR : sorbitol fermentation/oxidation					AMY : amygdalin fermentation/oxidation					
RHA : rhamnose fermentation/oxidation					ARA : arabinose fermentation/oxidation					



**Fig. 3. Structures of Tn5 lac plasmids.**  
 R : *EcoRI*, B : *BamHI*, S : *Sall*, X : *BamHI* site that was deleted.  
 — : Bal 31-generated deletions of Tn5 promoter.

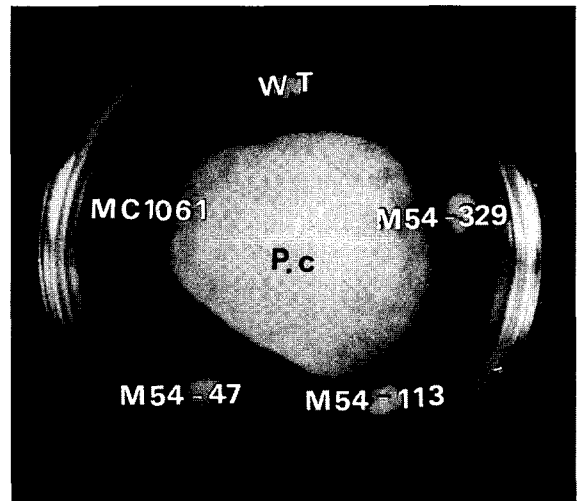
이렇게 선발된 돌연변이주들을 *Phytophthora capsici*와 *Pythium ultimum*과 동시배양하여 길항력을 검정한 결과 길항력의 변이를 일으킨 균주의 출현율은 1.4% 정도였으며 Tn5 lac의 전이빈도는  $1.5 \times 10^{-7}$ /수용균주 정도로 나타났다. 이와 같은 Tn5의 전이빈도는 Kroose 등(1984)이 P1::Tn5 lac을 *Myxococcus xantras*에 transduction시켰을 때, 변이주의 출현율이  $3 \times 10^{-9}$ /수용균주 빈도로 나타난다는 보고 보다 훨씬 높았다(6).

Tn5 lac이 삽입된 변이주 430여주 중에서 길항력이 변화된 6주를 선발하였는데 1주는 강화주, 3주는 상실주, 2주는 약화주인 것으로 나타났다(Table 4). 길항력 강화주인 M54-47은 야생주인 *Enterobacter* sp. B54에 비해 저해양상이 3주이상 지속될 뿐 아니라 저해 선단부의 분홍색이 짙게 나타났다(Fig. 4). 이러한 길항력의 증강현상은 feedback inhibition에 관련하는 조절유전자에 Tn5 lac이 삽입됨으로써 항곰팡이성 물질의 계속적인 생산에 기인할 수 있다. 또한 M54-113, M54-327과 M54-329는 길항력이 완전히 상실되었는데 이것은 길항 원인물질이

**Table 4. Antagonistic assay of Tn5 lac mutants to *Phytophthora capsici* and *Pythium ultimum***

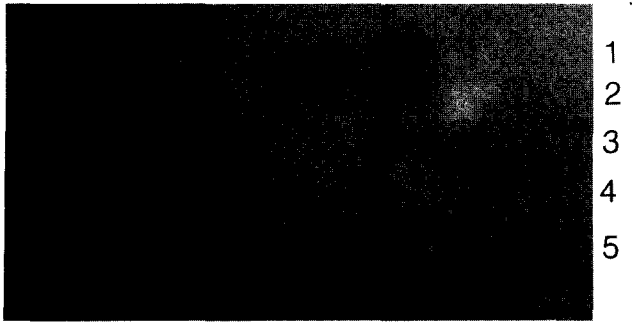
Mutants	Antagonistic activity	
	<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Pythium ultimum</i>
<i>Enterobacter</i> sp. B54 (wild type)	++	+
M 54-47	+++	+
M 54-62	+	-
M 54-113	-	-
M 54-252	+	-
M 54-327	-	-
M 54-329	-	-

-; Non-inhibitory effects against hyphal growths of hyphae of phytopathogenic fungi on PDA medium. +; weak antagonistic activity that growth-inhibition effects disappear within 36 hours after co-cultivation. ++; antagonistic activity that inhibition effects disappear within 3 days. +++; strong antagonistic activity that inhibition effects still remain after 2 weeks of co-cultivation.



**Fig. 4. Antagonistic assay of Tn5 lac mutants affected in antibiosis.**  
 \*P.c : *Phytophthora capsici*, *Escherichia coli* MC1061  
 W.T : *Enterobacter* sp. B54.

생합성에 필수적인 구조유전자에 Tn5 lac이 삽입되어 극성돌연변이를 유발함으로써 항곰팡이성 물질의 생합성에 결정적인 장애가 발생한 것으로 생각된다. 한편 길항력이 완전 상실된 변이주의 높은 출현율은 *Enterobacter* sp. B54가 생성하는 항곰팡이성 물질의 종류가 매우 적을 가능성을 암시해주는데 이것은 이 유전자에 Tn5 lac이 한두군데 삽입되어도 원인물질의 생성이 거의 상실되기 때문이다. 일반적으로 다양한 곰팡이의 성장을 저해하는 길항균은 여러가지 항생제들을 동시에 생성하고 이들의 생합성에 관련하는 유전자군이 여러곳에 집락형태로 분산되어 발현되기 때문에 한두군데의 transposon 삽입에 의한 길항력의 완전한 상실을 기대하기는 사실 어



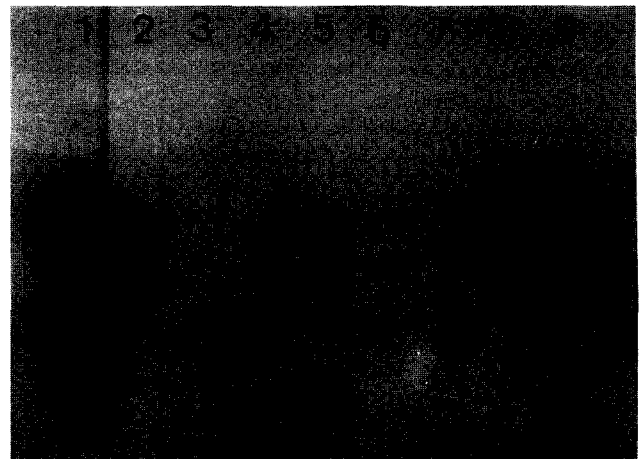
**Fig. 5. Southern hybridization analysis of Tn5 lac mutants to confirm Tn5 lac chromosomal insertions using EcoRI-digested chromosomal DNAs (probe: pRZ102)**

Lane # 1 :  $\lambda$ /HindIII                    2 : *Enterobacter* sp. B54/EcoRI  
 3 : M54-47/EcoRI                    4 : M54-113/EcoRI  
 5 : M54-329/EcoRI

럽다. 그러나 Vincent 등(1992)은 *Pseudomonas aureofaciens*가 생성하는 2,4-diacetylphloroglucinol의 생합성 관련 유전자에 Tn5를 삽입한 두 변이주에서 *Gauemannomyces graminis* var. *tritici*에 대한 완전한 길항력 상실을 보고하였다[11].

**길항력 변이주의 Tn5 lac 삽입 확인**

길항력 변이주의 Tn5 lac 삽입을 확인하기 위해 각 변이주의 염색체를 EcoRI으로 자른 뒤 0.6% agarose gel상에서 전기영동하여 절단여부를 확인한 후 nytran filter에 blotting하고 pRZ102(ColE1::Tn5)를 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP로 labelling하여 Southern hybridization한 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같다. *P. capsici*에 대한 길항강화균인 M54-47과 길항상실균인 M54-113과 M54-329는 14 kb와 17 kb부근에서 각각 단일 band로 나타났다. 이것은 Tn5 lac에 존재하는 lactose 유전자내의 EcoRI 부위에서 kanamycin 유전자가 있는 방향으로 전개된 인접유전자의 EcoRI부위까지의 DNA단편 크기를 의미하는 것이며 이들 변이주들의 염색체상에서 Tn5 lac이 single copy로 삽입되어 있음을 나타내기 때문에 길항력에 관여하는 유전자를 용이하게 분리해 낼 수 있을 것으로 생각된다. 또한 Tn5 lac 내에 EcoRI 부위가 하나 존재함에도 두 band가 아닌 단일 band로 나타나는 이유는 Fig. 3에서 Tn5 sequence가 EcoRI site의 왼쪽에 있는 약 70 bp를 제외하고는 대부분 오른쪽에 존재하므로 왼쪽 sequence는 pRZ102를 probe로 사용했을 때 signal을 보여주지 않기 때문이다. Fig. 6은 M54-47과 M54-113의 전체 DNA를 BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI으로 잘라 pRZ102를 probe로 Southern hybridization한 결과인데 동일 제한효소로 절단시 밴드 양상이 다르게 나타남으로써 역시 Tn5 lac이 염색체내의 다른 위치에 삽입되었음을 알 수 있었다. 수용균에 대한 Tn5 lac의 염색체내 무



**Fig. 6. Confirmation of Tn5 lac insertions into chromosomal DNA of M54-47 and M54-113 by Southern hybridization (probe: pRZ102).**

1 :  $\lambda$ /HindIII                    2 : M54-47/BamHI                    3 : M54-47/EcoRI  
 4 : M54-47/HindIII                    5 : M54-47/KpnI                    6 : M54-113/BamHI  
 7 : M54-113/EcoRI                    8 : M54-113/HindIII                    9 : M54-113/KpnI

작위 삽입현상은 Koo 등[5]과 Kroos 등[6]의 보고와 동일하였으며 Tn5에 의한 돌연변이 유발시 삽입위치의 무작위성은 *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Caulobacter crescentus*, *Rhizobium meliloti*, *Xanthomonas campestris* 등에서 이미 보고된 바 있다. 그러나 이 반면에 Singer 등[10]은 *Acinetobacter* sp.에 Tn5 돌연변이를 유기하였을 때 특정부위에만 집중적으로 삽입된다고 보고하였지만 이는 수용균주의 염색체내 특정 염기배열이 Tn5의 삽입을 특이적으로 유도하는 것이 아닌가 생각된다. M54-113과 M54-329의 Tn5 lac이 삽입된 17 kb EcoRI 단편은 다른 제한효소로 절단하여 Southern hybridization을 하면 상이한 signal band 양상을 보여주었기 때문에 동일한 위치에 삽입되지 않음을 알 수 있었다(미공개 자료). 이상의 결과들에서 보는 바와 같이 P1::Tn5 lac 돌연변이유기에 의해 길항력 강화 변이주와 상실 변이주를 선발함으로써 고추역병균의 성장저해에 관련하는 길항유전자 탐색의 토대를 마련하였다.

**요 약**

고추역병균(*Phytophthora capsici*)의 성장을 *in vitro*에서 저해하는 길항균 B14를 한국토양으로부터 분리 동정하여 *Enterobacter*속임을 밝혔고 P1::Tn5 lac에 의해 transposon 돌연변이를 유기하여 길항력 강화주와 약화주들의 염색체내에 Tn5 lac이 각기 상이한 위치에 무작위로 삽입되었음을 southern hybridization에 의해 확인하였다.

## REFERENCES

1. Berg, D. E. and C. M. Berg. 1983. The prokaryotic transposable element Tn5. *Bio/Technology* **1**: 417–434.
2. Daniels, M. J., C. E. Barber, and P. C. Turner. 1984. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *The EMBO J.* **3**: 3323–3328.
3. Gunji, S., K. Arima, and T. Beppu, 1983. Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 2061–2069.
4. Klee, H. J. and F. F. White. 1983. Mutational analysis of the virulence region of *A. tumefaciens* tumor inducing plasmid that counters a narrow host range. *J. Bacteriol.* **660**: 564–568.
5. Koo, B. S., W. W. Seo, S. H. Yoon, and Y. H. Kim. 1992. Transposon Tn5 *lac* mediated mutagenesis of antagonistic *Pseudomonas maltophilia* B14 *Res. Rept. RDA.* **34**: 27–31.
6. Kroos, L. and D. Kaiser 1984. Construction Tn5 *lac*, a transposon that fuses *lacZ* expression to exogenous promoters, and its introduction into *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 5816–5820.
7. Murata, N., H. Murant, H. Fujii, and C. Sasakawa. 1988. Behavior of R388 rep (Ts):: Tn5, a thermosensitive Tn5 vector, and its derivatives in *Erwinia carotovora* and some species of *Rhizobiaca*. *Curr. Microbiol.* **17**: 293–298.
8. Noel, K. D. and A. Sanchez. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* **12**: 148–155.
9. Simon, R., U. Priefer, and A. P hler. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering : Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**: 784–791.
10. Singer, J. T. and W. R. Finnerty. 1984. Insertional specificity of transposon Tn5 in *Acinetobacter* sp. *J. Bacteriol.* **157**: 607–611.
11. Vincent, M. N., L. A. Harrison, J. M. Brackin, P. A. Kovacevich, P. Mukerji, D. M. Weller, and E. A. Pierson. 1991. Genetic analysis of the antifungal activity of a soil-borne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2928–2934.

(Received June 29, 1998)