

## 土壤病害拮抗性 *Pseudomonas maltophilia* B-14의拮抗遺傳子探索

구본성\* · 서영우 · 김용환 · 윤상홍 · 오상수 · 박경수<sup>1</sup> · 류진창 · 은무영

농업유전공학연구소 분자유전과, <sup>1</sup>조선대학교 자연과학대학 생물학과

## Molecular Cloning of Antagonistic Genes in *Pseudomonas maltophilia* B-14

Koo, Bon-Sung\*, Young-Woo Seo, Young-Whan Kim, Sang-Hong Yoon,  
Sang-Soo Oh, Kyung-Soo Park<sup>1</sup>, Jin-Chang Ryu and Moo-Young Eun

Molecular Genetic Division, Agricultural Biotechnology Institute, Suwon 441-707, Korea

<sup>1</sup>Department of Biology, College of Natural Sciences, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

**Abstract** — *Pseudomonas maltophilia* B-14 produces antibiotic substances which inhibit the growth of plant pathogenic fungi such as *Phytophthora* spp. and *Rhizoctonia solani*. In order to isolate antagonistic genes, the pAG67 and pAG81 containing flanking sequences related to antifungal activities were selected by Tn5 *lac* mediated mutagenesis of *Pseudomonas maltophilia* B-14. The flanking sequences of pAG67 and pAG81 were cloned into pBR325 and constructed physical maps after analysis of Southern hybridization with <sup>32</sup>P labeled *Pseudomonas maltophilia* B-14 chromosomal DNA, respectively. Finally we selected seven cosmid clones containing the antagonistic related genes from the genomic library through the colony hybridization with <sup>32</sup>P-labeled flanking sequences as probes.

길항 미생물을 이용한 식물병해의 생물학적 방제는 유기 합성 농약제의 과량 사용으로 야기되는 여러가지 문제점을 해결하기 위한 대체수단으로 관심이 고조되고 있다.

식물병원균에 길항력을 갖는 미생물들은 병원균 저해 작용에 따라 균종이 상이하나 *Pseudomonas*(1, 2), *Bacillus*(3), *Trichoderma*(4) 등이 주종을 이루고 있으며 최근 작물의 병해 방제용으로 많이 개발 이용되고 있는 생물농약 및 길항 미생물원은 *Pseudomonas* 및 *Streptomyces*속 등이 대부분이다(1, 5, 6).

식물병원균의 생물학적 방제를 위한 길항 미생물은 *Erwinia carotovora*(7), *Pseudomonas phaseolicola*(8), *Pseudomonas syringae*(9) 등이 보고되어 있으며, 특히 최근에는 식물병원균의 길항유전자 cloning 및 유전자의 구조 해석등 다양한 연구가 수행되고 있다(10, 11).

본 실험에 앞서 채소입고병원균(*Rhizoctonia solani*) 및 고추역병균(*Phytophthora capsici*)과 참깨역병균(*Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*)의 다수의 식물병원균에 복합적으로 길항작용을 갖는 *Pseudomonas maltophilia* B-14(12, 13)의 길항 관련 유전자는 염색체 DNA상에 있음을 보고한 바 있으며(12), cosmid vector를 이용하여 유전자 은행을 제작하였고(13), Transposon Tn5로 *P. maltophilia* B-14를 돌연변이시켜 길항력이 상실된 균주 T-67 및 T-81을 선발하여 보고한 바 있다(14). 따라서 본 실험은 transposon Tn5 *lac*으로 돌연변이시켜 선발(14)한 길항력 변이종 T-67 및 T-81의 Tn5 *lac* 삽입부위를 cloning하여 유전자 은행으로부터 길항관련 유전자를 분석한 몇가지 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 채소입고병원균(*Rhizoctonia solani*), 고추 역병균(*Phytophthora capsici*) 및 참

**Key words:** Flanking sequence, physical map, Tn5 *lac* mutagenesis, genomic library, antagonistic gene, *Pseudomonas maltophilia*, *Phytophthora*

\*Corresponding author

개역병균(*Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*) 등 다수의 식물병원균 성장을 저해하는 *Pseudomonas maltophilia* B-14를 transposon Pl::Tn5 *lac*(15)으로 돌연변이시켜 선발한 변이주, 즉, 채소입고병원균에 길항력이 약화된 T-67 및 고추역병원균과 참깨역병원균에 길항력이 약화된 T-81을 공시균주로 사용하였으며 길항관련 유전자 형질전환은 *E. coli* MC 1061을 사용하였다.

공시균주의 증식은 LB broth(Bacto-trypton 10 g, yeast extract 5 g, sodium chloride 10 g/l) 및 1.5% agar가 첨가된 LB 평판 배지를 사용하였으며 *E. coli*는 37°C, *Pseudomonas maltophilia* T-67 및 T-81은 28°C 에서 배양하였다.

### Tn5 *lac* 삽입부위 cloning 및 확인

Tn5 *lac* 삽입에 의하여 길항력이 약화된 T-67 및 T-81의 genomic DNA를 Chesney(16)의 방법으로 추출한 후 각각 *EcoRI* 제한효소로 절단하여 0.8% agarose gel에 전기영동한 후 Tn5 *lac* 일부와 flanking sequence를 포함한 크기인 8~20 Kb 범위의 DNA를 잘라내어 electroelution으로 회수하고 pBR325 vector의 chloramphenicol 유전자내에 있는 *EcoRI* site에 재조합하여 *E. coli* MC1061에 형질전환하고 kanamycin 유전자를 표지 인자로 선발하였으며, Pl::Tn5 *lac*의 Tn5 *lac* *EcoRI* 단편을 probe로 사용하여 Southern hybridization(17)으로 확인하였다.

### 길항관련 유전자 flanking sequence 확인 및 제한효소 지도작성

항생제 배지에서 선발한 Tn5 *lac*과 그 인접부위가 cloning된 재조합체의 plasmid DNA를 분리하여 여러가지 제한효소로 절단하고 0.8% agarose gel에 전기영동하여 Nytran membrane에 흡착시킨 후 야생 길항균 *Pseudomonas maltophilia* B-14의 염색체 DNA를 probe로 사용하여 길항관련 유전자의 flanking sequence를 확인하였고, 각각의 제한효소 단편들의 이동 거리를 측정하여 제한효소 지도를 작성하였다.

### Cosmid gene bank로부터 길항관련 유전자 보유 clone 선발

Tn5 *lac* 삽입부위가 cloning된 pAG67 및 pAG81의 DNA를 분리하여 pAG67은 *EcoRI*-*BglII*, pAG81을 *EcoRI*-*HpaI*으로 이중절단하여 *lac* 유전자가 제거된

Tn5 일부와 길항관련 유전자 flanking sequence가 포함된 DNA단편을 probe로 사용하여 기 제작된 cosmid gene library(13)로부터 길항관련 유전자가 cloning된 균주를 colony hybridization(17)으로 선발하였다.

## 결과 및 고찰

### Tn5 *lac* 삽입부위 cloning

Transposon Tn5 *lac*의 삽입에 의하여 채소입고병원균에 길항력이 약화된 T-67 변이주와 고추역병원균 및 참깨 병원균에 길항력이 약화된 T-81 변이주의 Tn5 *lac* 삽입부위를 pBR325의 chloramphenicol 유전자내에 있는 *EcoRI* site에 cloning하기 위한 전략은 Fig. 1과 같다.

일반적으로 Tn5가 삽입된 변이주의 Tn5 삽입부위를 cloning할 때는 wild type Tn5내에 인지부위가 없는 *EcoRI* 제한효소를 많이 사용하는데(18, 19), 본 실험에 사용한 Tn5 *lac*의 경우에는 Tn5 왼쪽 inverted repeat sequence(IS50L)에 재조합시켜 놓은 *trp-lac* 유전자의 *lac* 유전자 중간부위에 하나의 *EcoRI* site가 존재하여 *EcoRI*으로 절단할시 *trp-lac* 유전자 일부를 가지는 4 Kb 단편과 *lac* 유전자 일부와 Tn5의 kanam-

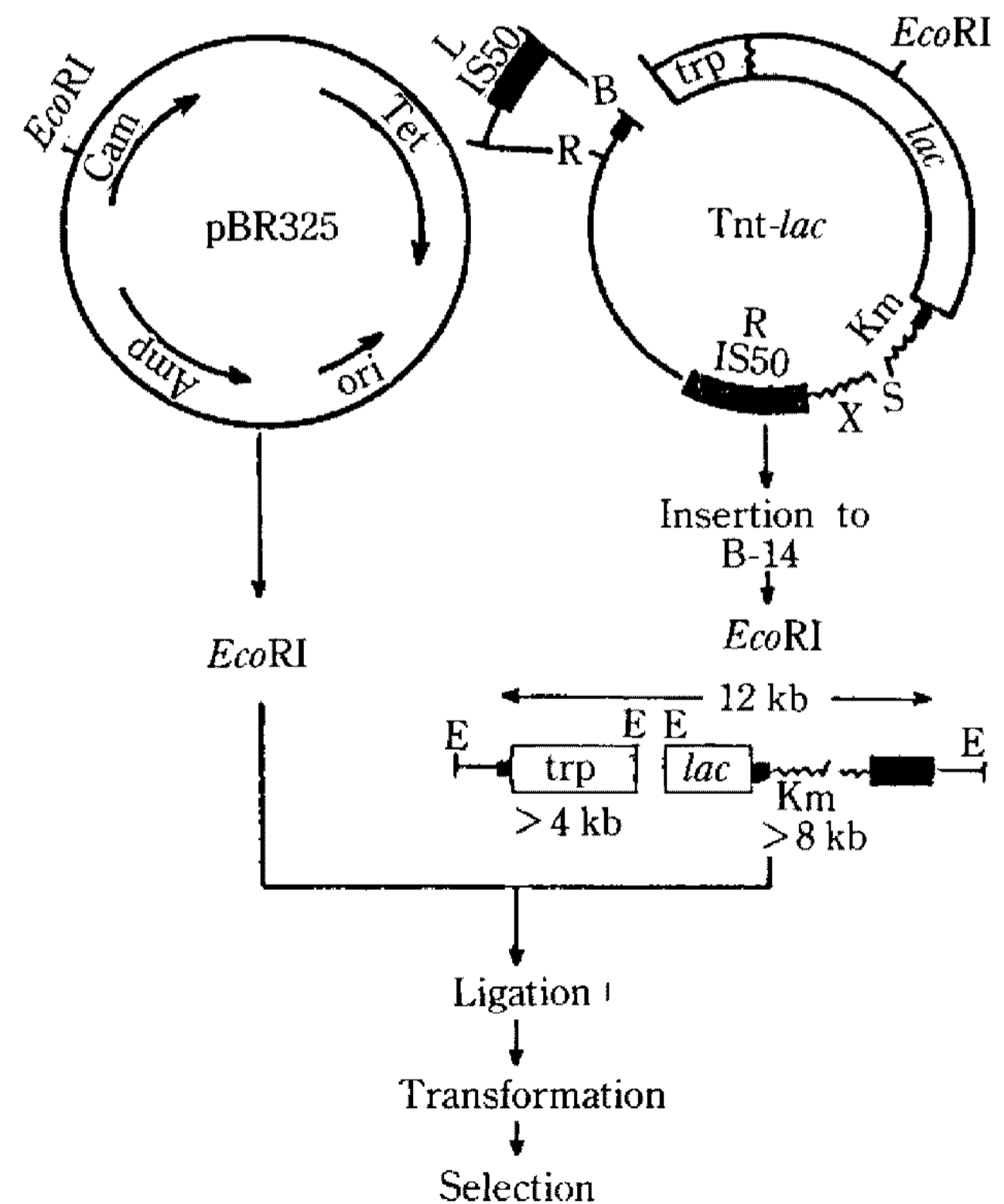
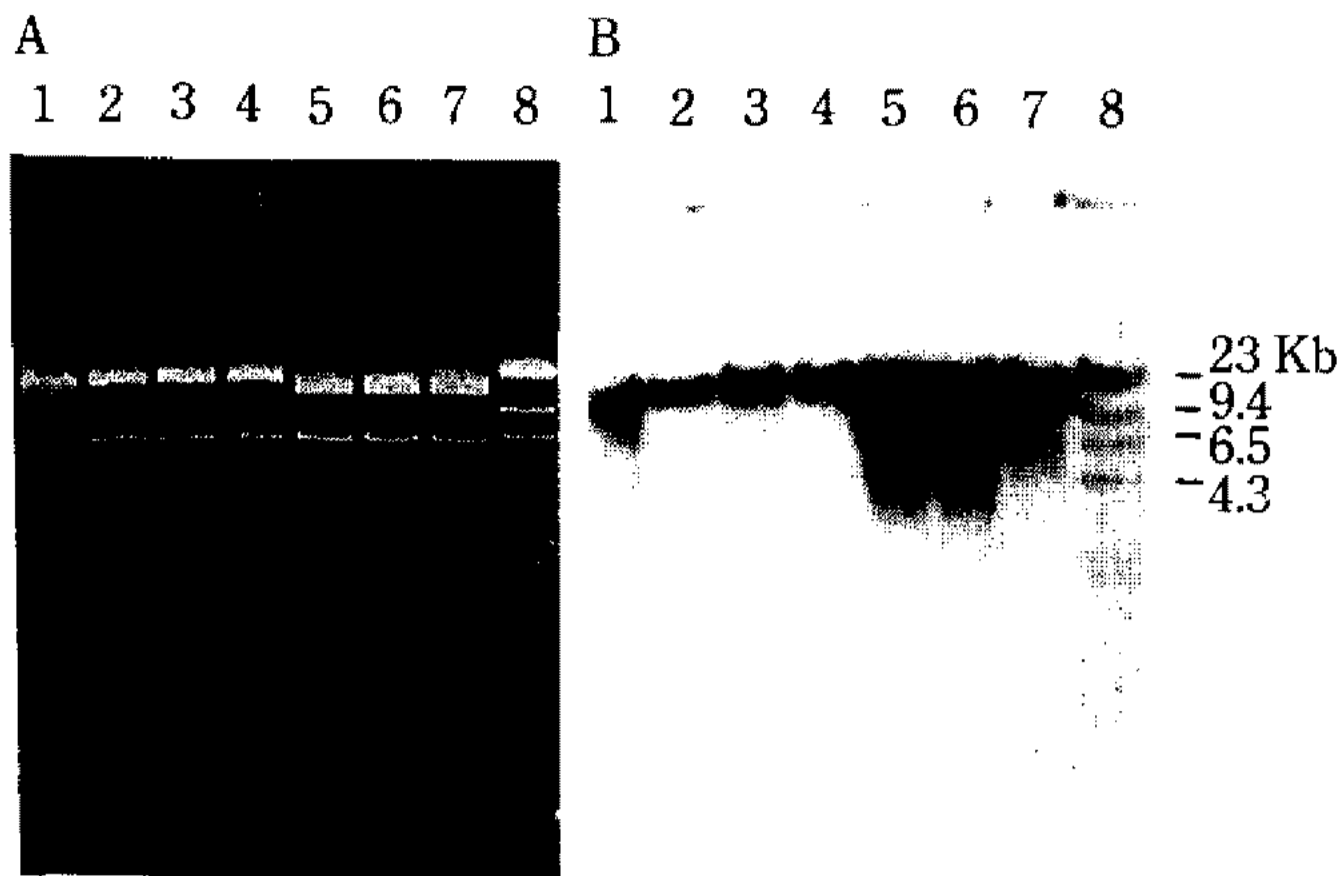


Fig. 1. Scheme for cloning a gene by transposon mutagenesis.



**Fig. 2. Southern blot hybridization analysis of Tn5 lac inserted region in pAG67 and pAG81.**

(A) pAG67 and pAG81 DNA were digested with *EcoRI* and electrophoresed on a 0.8% agarose gel.

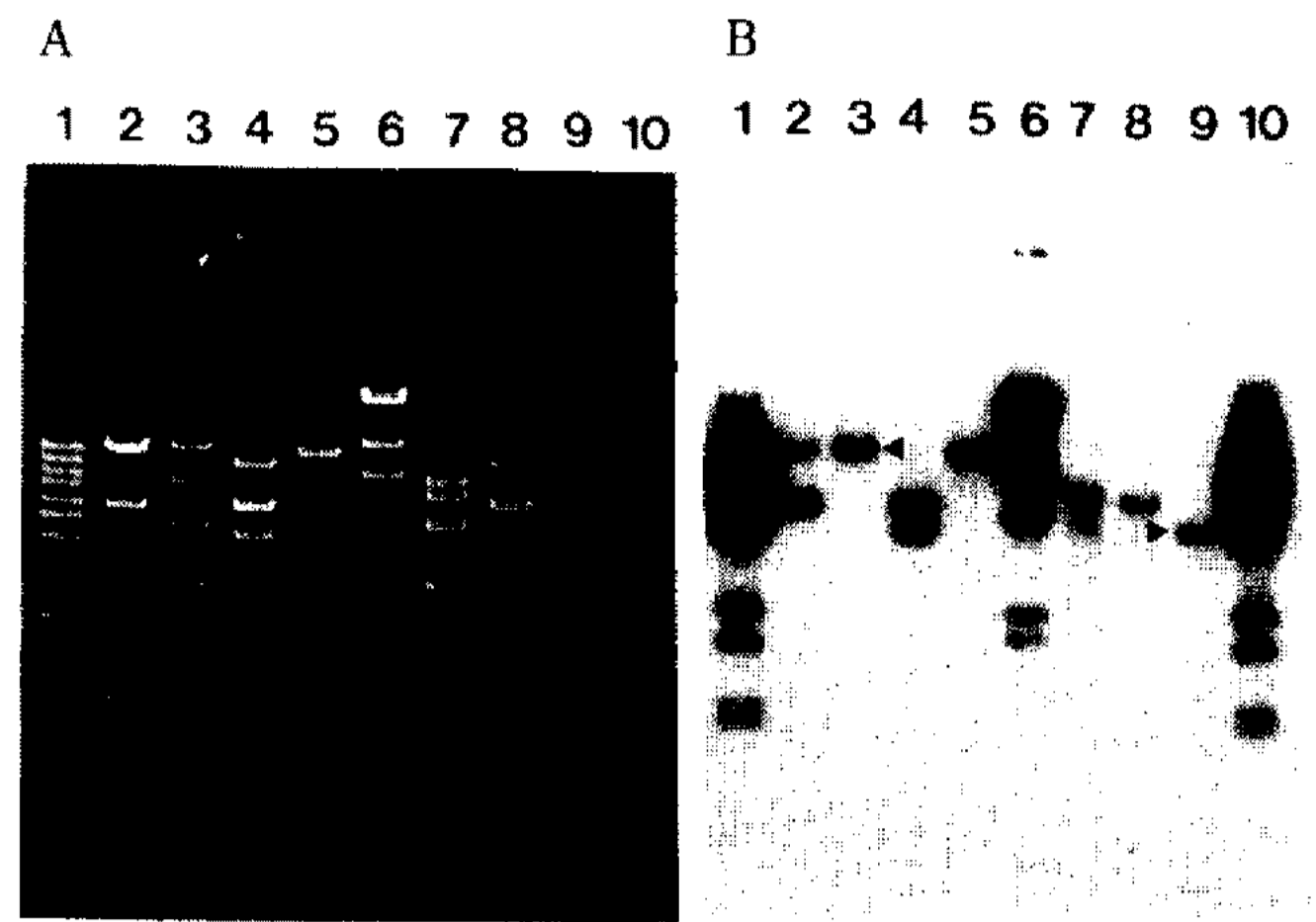
Lane 1; pAg317 cut with *EcoRI*; The pAG317 was cloned Tn5 lac-*EcoRI* fragment in P1::Tn5 lac with pSUP 205.

(B) Autoradiogram of a southern blot hybridization of the same gel probed with a mixture of lambda DNA and Tn5 lac *EcoRI* fragment from PAG317 <sup>32</sup>P-labeled by nick translation.

ycin 유전자를 포함한 중앙부 및 inverted repeat sequence(IS50R)을 가지는 8 Kb 크기의 두가지 단편으로 분리가 된다(15).

따라서 본 실험에 사용한 변이주들의 염색체 DNA를 *EcoRI*으로 절단하면 20~30 bp의 IS50L 일부와 *trp-lac* 유전자 일부를 가진 4 Kb 단편 왼쪽 말단과 *lac* 유전자 일부와 kanamycin 및 IS50R 단편의 8 Kb 오른쪽 말단에 길항관련 유전자의 flanking sequence를 가진 두 종류의 DNA 단편이 형성되는데 이렇게 절단된 T-67 및 T-81의 염색체 DNA 중 *lac* 유전자 일부와 Tn5의 kanamycin 유전자 및 IS50R 단편을 가진 8 Kb 오른쪽 말단에 길항관련 유전자의 flanking sequence를 가진 DNA 단편을 효과적으로 cloning하기 위하여 0.8% agarose gel에 전기영동한 후 8~20 Kb 범위의 DNA 단편을 electroelution으로 회수하여 pBR325의 chloramphenicol 유전자내에 있는 *EcoRI* site에 cloning시켜 Tn5내에 있는 kanamycin 유전자의 발현을 보고 형질전환체를 선발하였다.

이렇게 하여 선발한 형질전환체의 재조합 plasmid를 분리한 후 *EcoRI* 제한효소로 절단하고 전기영동으로 확인한 결과 Fig. 2-A에서 보는 바와 같이 약 15 Kb 크기의 DNA가 채소입고 병원균에 길항력이 약화된 T-67 균주로부터 cloning이 되었고 또한 약



**Fig. 3. Southern blot hybridization of flanking sequence in pAG67 and pAG81.**

(A) pAG67 and pAG81 DNA were digested with several restriction enzymes, electrophoresed on a 0.8% agarose gel.

- |   |   |
|---|---|
| 1, 10. λ DNA/ <i>BstEII</i>             | 6. λ DNA/ <i>HindIII</i>                |
| 2. pAG67/ <i>HindIII</i>                | 3. pAG67/ <i>EcoRI</i> + <i>BglII</i>   |
| 4. pAG67/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> | 5. pAG67/ <i>EcoRI</i> + <i>HpaI</i>    |
| 7. pAG81/ <i>EcoRI</i> + <i>BglII</i>   | 8. pAG67/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> |
| 9. pAG81/ <i>EcoRI</i> + <i>HpaI</i>    |   |

(B) Southern blot hybridization of the same gel was carried out with a mixture of λ and wild-type B-14 chromosomal DNA as the <sup>32</sup>P-labeled probe by nick translation.

12 Kb 크기의 DNA가 고추역병균 및 참깨역병균에 길항력이 약화된 T-81 균주로부터 cloning이 되었음을 알 수 있었으며(이들 각 clone을 pAG67 및 pAG81로 명명하였음) 이들 각각의 clone들을 P1::Tn5 lac vector의 Tn5 lac 단편을 probe로 사용하여 Southern hybridization으로 길항관련 유전자의 flanking sequence를 포함한 Tn5 lac 단편이 삽입되었음을 확인하였다(Fig. 2-B).

### 길항관련 유전자 flanking sequence 확인 및 제한효소 지도작성

채소입고 병원균에 대한 길항력이 약화된 변이주 T-67의 Tn5 lac 삽입부위가 cloning된 pAG67 및 고추역병균과 참깨역병균에 길항력이 약화된 T-81의 Tn5 lac 삽입부위가 cloning된 pAG81의 plasmid DNA를 추출한 후 *EcoRI*, *HindIII*, *BglII*, *HpaI* 등의 제한효소를 단독 및 이중으로 처리한 다음 전기영동한 결과는 Fig. 3-A와 같으며 동일 gel의 DNA를 Nytran membrane에 흡착시키고 wild type 길항균 *Pseudomonas maltophilia* B-14의 염색체 DNA를 shearing한

다음 <sup>32</sup>P 동위원소로 라벨하여 Southern hybridization한 결과(Fig. 3-B) Tn5 lac 단편의 오른쪽 말단에 존재하는 길항관련 유전자의 flanking sequence가 cloning되었음을 알 수 있었으며 이들 결과를 종합하여 각각의 유전자 지도를 작성한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 pAG67 clone에는 약 8 Kb 크기의 flanking sequence가 cloning되었으며 pAG81 clone에는 약 4 Kb 크기의 flanking sequence가 cloning되었음을 알 수 있었다.

이와같이 transposon Tn5로 돌연변이시킨 변이주

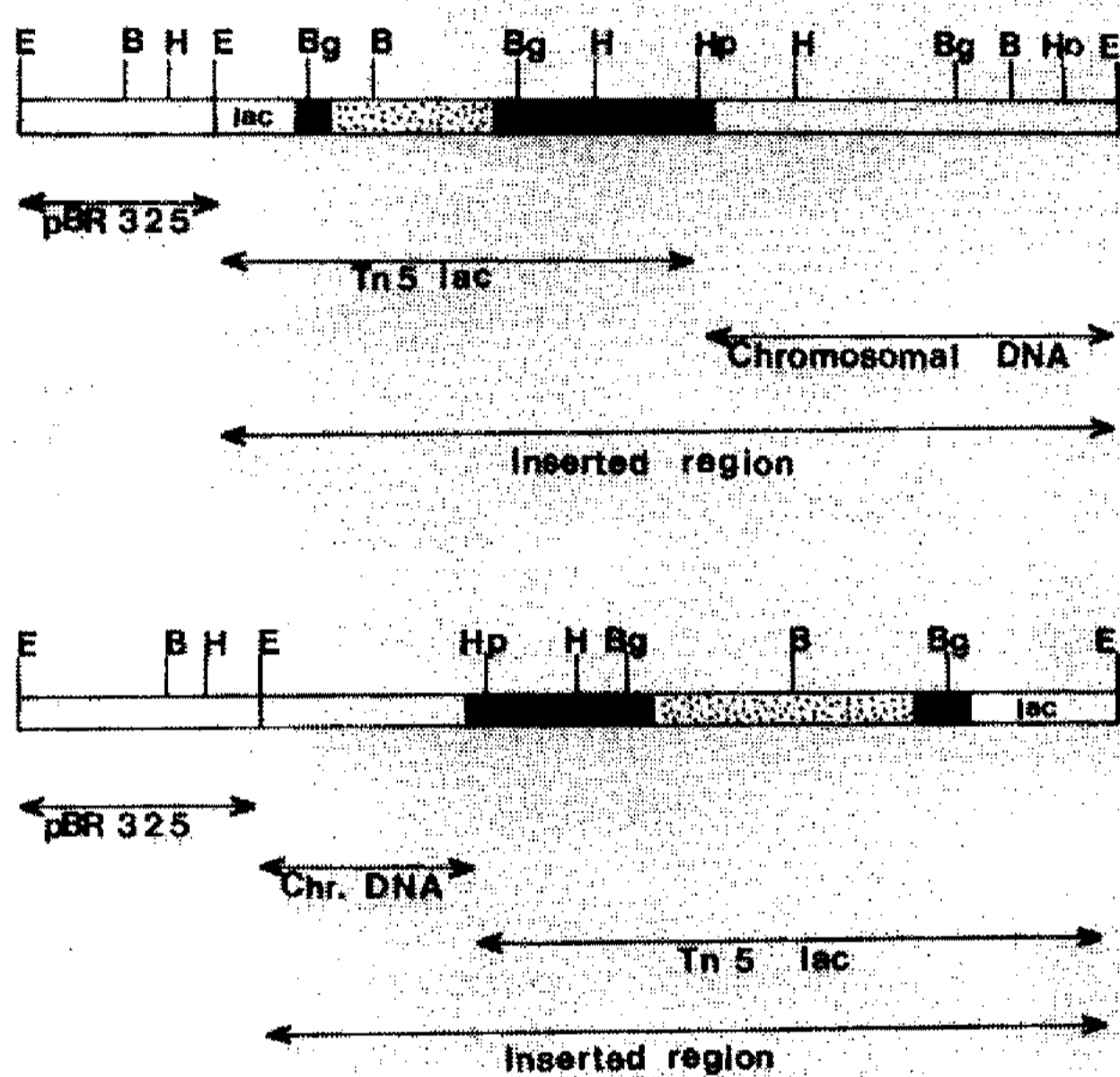


Fig. 4. Physical map of pAG67(A) and pAG81(B). B: BamHI, Bg: BglIII, E: EcoRI, H: HindIII, Hp: HpaI, Km: kanamycin(or NPTII)

로부터 특정유전자의 flanking sequence를 선발한 보고는 *Pseudomonas syringae*(20), *Pseudomonas fluorescense*(19) 등 많은 논문이 보고되어 있으며 Tn5가 삽입된 위치에 따라 flanking sequence의 크기 또한 상당히 다르게 보고되어 있다(21, 22).

Cosmid gene library로부터 길항관련 유전자 clone 선발

Tn5 lac 유전자 일부와 길항관련 유전자 flanking sequence가 cloning된 pAG67 및 pAG81 clone을 probe로 사용하여 *E. coli* HB101에 제작된 cosmid gene library(13)로부터 길항관련 유전자를 보유한

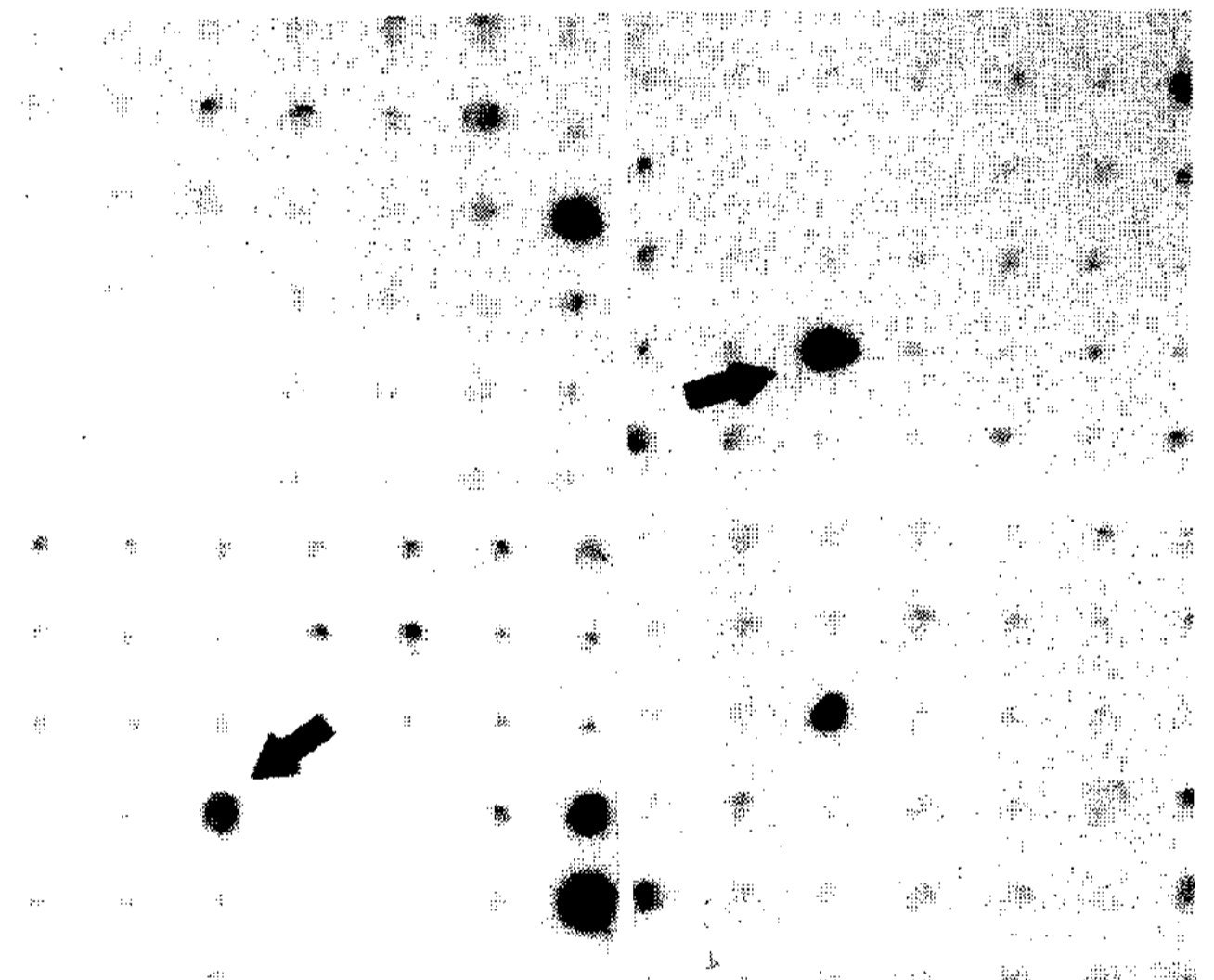


Fig. 5. Colony hybridization of gene bank-clones with <sup>32</sup>P-labeled flanking sequence of pAG67.

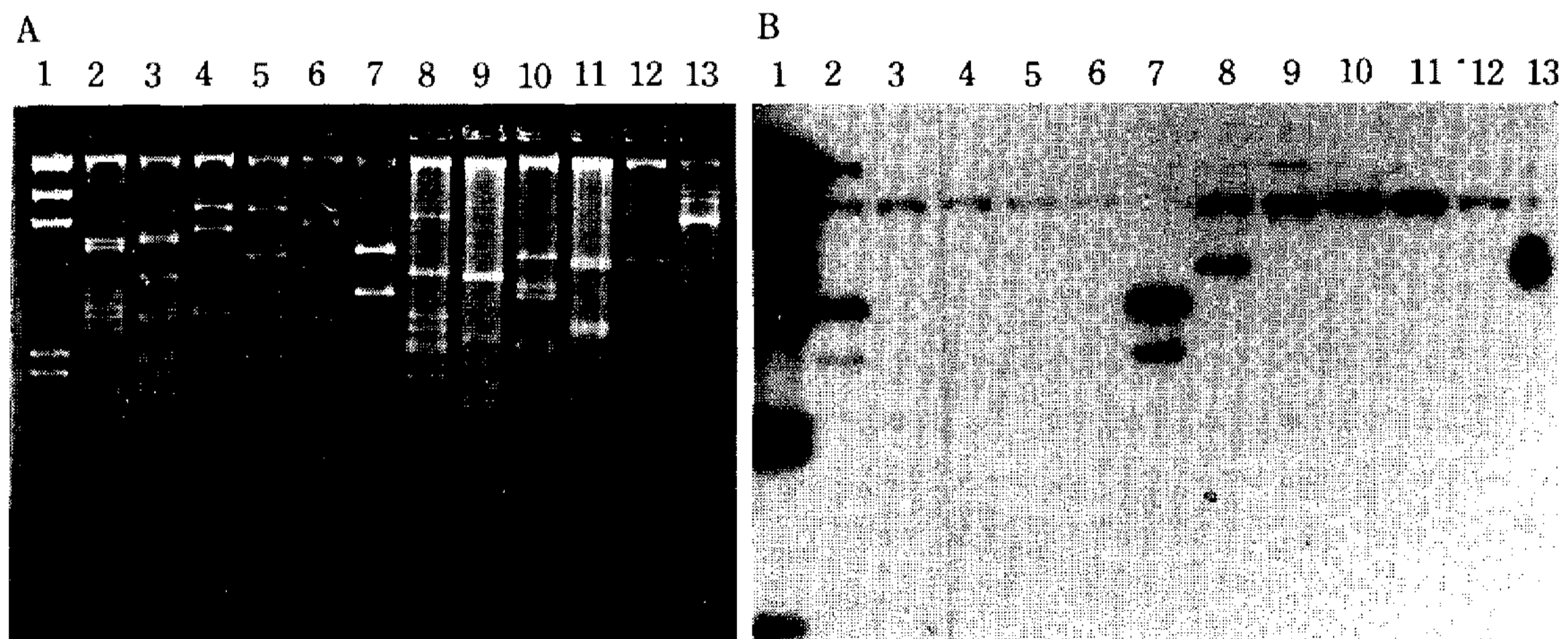


Fig. 6. Southern blot hybridization of double digested cosmid clones with <sup>32</sup>P-labeled flanking sequence of pAG67. (A) Cosmid clones were double digested with EcoRI-BamHI and EcoRI-PstI. Lane 1; λ HindIII, 2-7; EcoRI-BamHI, 8-13; EcoRI-PstI (B) Southern blot hybridization of the same gel with <sup>32</sup>P-labeled flanking sequence of pAG67.

clone을 선별하기 위해서는 pAG67 및 pAG81 cloning시에 포함된 *lac* 유전자 단편을 제거한 뒤 사용해야 하는데 이는 유전자 은행 제작시 사용했던 숙주인 *E. coli* HB101이 *lac* 유전자를 가지고 있기 때문에 colony hybridization 으로 선별할 수가 없다. 따라서 본 실험에 사용한 probe DNA는 Fig. 4에서 본 바와 같이 pAG67은 *EcoRI*-*Bgl*II, pAG81은 *EcoRI*-*Hpa*I으로 절단한 뒤 Tn5의 IS50R 일부와 길항관련 유전자 flanking sequence 부분만을 electroelution으로 회수한 다음 <sup>32</sup>P 동위원소로 라벨하여 cosmid gene library로부터 재조합 clone 7개주를 선별하였으며 (Fig. 5) 이들 cosmid DNA를 추출한 후 제한효소로 절단하고 동일한 probe를 사용하여 Southern hybridization으로 상당히 큰 길항관련 유전자 단편이 재조합된것을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

이와같이 transposon을 이용한 돌연변이주로부터 선별한 특정 유전자의 flanking sequence를 probe로 genomic library에서 관련 유전자를 선별한 보고는 Teiichi 등이 *Myxococcus xanthus*를 TnV로 돌연변이시켜 얻은 변이주로부터 TnV 삽입부위를 cloning한 다음 유전자 은행으로부터 세포발생에 관계하는 유전자를 선별한 보고(22)와 Pelin 등이 Tn5를 이용하여 *Pseudomonas solanacearum*의 병원성 유전자를 선별한 보고(18) 및 목화 입고병원균의 성장을 저해시키는 *Pseudomonas fluorescent*의 길항관련 유전자를 선별한 보고 등(23) 상당히 많은데 본 실험에서 선별한 길항관련 유전자는 그 구조 및 발현기작을 연구하는데 많은 도움을 줄 것으로 사료된다.

## 요 약

Tn5 *lac* 삽입으로 채소입고병원균에 길항력이 약화된 T-67 및 고추역병균과 참깨역병균에 길항력이 약화된 T-81의 Tn5 *lac* 유전자 일부와 오른쪽 말단에 있는 길항관련 유전자의 flanking sequence가 cloning된 pAG67 및 pAG81 clone을 선별하였고, pAG67 및 pAG81에 cloning된 길항관련 유전자의 flanking sequence를 야생 길항균 *Pseudomonas maltophilia* B-14의 염색체 DNA를 probe로 사용하여 Southern hybridization으로 확인하였으며, 제한효소 지도를 작성하여 8 Kb 및 4 Kb 크기의 flanking sequence가 cloning되었음을 확인하였다. pAG67 및 pAG81의 flanking sequence를 *EcoRI*-*Bgl*II와 *EcoRI*-*Hpa*I으로 분리하여 유전자 은행으로부터 길항관련 유전자가 clo-

ning된 cosmid clone 7개주를 선별하였다.

## 참고문헌

1. Michael, A.H. and P.E. Nelson. 1972. Antagonistic effect of soil bacteria on *Fusarium roseum culmorum* from carnation. *Phytopathol.* **62**: 1052-1056.
2. Middlebrook, J.L. and R.B. Dorland. 1984. Bacterial toxin: cellular mechanisms of action. *Microbiol. Rev.* **Sept**: 199-221.
3. Brodbent, R. and K.F. Baker. 1977. Effect of *Bacillus* spp. on increase growth of seedling in nontreated soil. *Phytopathol.* **67**: 1027-1034.
4. Hadar, Y., I. Chet and Y. Henis. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathol.* **69**: 64-68.
5. Chung, Y.R., M.S. Chung and S.H. Ohh. 1982. Identification of *Streptomyces* species antagonistic of *Fusarium solani* causing ginseng root rot. *Kor. J. Microbiol.* **20**: 73-79.
6. Baker, K.F., and R.J. Cook. 1982. *Biological Control of Plant Pathogens*. pp. 433-443. The American Phytopathological Soc. St. Paul Minnesota.
7. Zink, R.T., R.J. Kemble and A.K. Chatterjee. 1984. Transposon Tn5 mutagenesis in *Erwinia* subsp. *carotovora* and *E. carotovora* subsp. *atroseptica*. *J. Bacteriol.* **57**: 809-814.
8. Peet, R.C., P.B. Lindgren, D.K. Willis and N.J. Panopoulos. 1986. Identification and cloning of genes involved in phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* **166**: 1095-1105.
9. Anderson, D.M. and D. Mills. 1985. The use of transposon mutagenesis in isolation of nutritional and virulence mutants in two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Phytopathol.* **75**: 104-108.
10. Vincent, M.N., L.A. Haerison, J.M. Bracleim, P.A. Kovacevichi, P. MuRerji, D.M. Weller and Z.A. Pierson. 1992. Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2928-2934.
11. Person, L.S. and L.S. Thomashow. 1992. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**: 330-339.
12. Lee, J.B., B.S. Koo, S.H. Yoon, Y.H. Kim, T.Y. Chung and J.C. Ryu. 1988. Plasmid characteristics of antagonistic bacteria against soil borne plant pathogenic fungi. *Res. Rept. RDA(B)*, **30**(3): 34-43.
13. Koo, B.S., and Y.W. Seo, S.H. Yoon, S.S. Oh, J.C. Ryu and T.Y. Chung. 1991. Construction of the

- genomic library of antagonistic *Pseudomonas* spp. B-14 with cosmid vector pLAFR3. *Res. Rept. RDA(B)*. **33(1)**: 20-26.
14. Koo, B.S., and Y.W. Seo, S.H. Yoon, Y.H. Kim, S.S. Oh, J.C. Ryu and M.Y. Eun. 1992. Transposon Tn5 *lac* mediated mutagenesis of antagonistic *Pseudomonas maltophilia* B-14. *Res. Rept. RDA(B)*. **3(1)**: 27-31.
  15. Kroose, L., and D. Kaiser. 1984. Construction of Tn5 *lac*, a transposon that fuses *lacZ* expression to exogenous promoters, and its introduction into *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 5816-5820.
  16. Cheseny, R.H., J.R. Scott, and D. Vapnek. 1979. Integration of the plasmid prophage p1 and p7 into the chromosome of *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **130**: 165-171.
  17. Susan, L.B., and M. Mahmoudi. 1985. Comparison of oligonucleotide and long DNA fragment as probes in DNA and RNA dot, southern, northern, colony and plaque hybridization. *Biotechniques*. **May/June**: 208-220.
  18. Peilin, X., S. Leong, and L. Sequeira. 1988. Molecular cloning of genes that specify virulence in *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.* **170**: 617-622.
  19. Alan, R.P., Y.F. Peng, and A.H. Ellingboe. 1988. Genetics of antibiosis in bacterial strains suppressive to Take-All. *Mol. Plant Pathol.* **78**: 426-432.
  20. Dirk, M.A., and D. Mill. 1985. The use of transposon mutagenesis in the isolation of nutritional and virulence mutants in two pathovar of *Pseudomonas syringae*. *phytopathol.* **75(1)**: 104-108.
  21. Michal, K.M., and A.K. Chatterjee. 1985. Isolation and characterization of Tn5 insertion mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* altered in the production of the peptide phytotoxin syringotoxin. *J. Bacteriol.* **164**: 14-18.
  22. Teiichi, F., M. Inouye, and S. Inouye. 1985. Novel one-step cloning vector with a transposable element; Application to the *Myxococcus xanthus* genome. *J. Bacteriol.* **164**: 270-275.
  23. Neal, I.G. and T.J. Layton, 1986. Molecular cloning of genetic determinants for inhibition of fungal growth by a fluorescent *Pseudomonad*. *J. Bacteriol.* **165**: 696-703.

(Received October 2, 1992)