

최            종  
연구보고서

Rhizobacteria의 유도 저항성에 의한  
식물병 방제 기술 확립

Establishment of a plant disease control method  
using systemic resistance induced by rhizobacteria

연구기관  
전남대학교 농업생명과학대학

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Rhizobacteria의 유도 저항성에 의한 식물병 방제 기술 확립” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 10월 7일

주관연구기관명 : 전 남 대 학 교

총괄연구책임자 : 김 영 철

세부연구책임자 : 김 영 철

세부연구책임자 : 조 백 호

# 여 백

# 요 약 문

## I. 제 목

Rhizobacteria의 유도 저항성에 의한 식물병 방제 기술 확립

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

식물 뿌리에 서식하는 *Pseudomonas*나 *Serratia*속 등의 몇 가지 식물 근권 세균(rhizobacteria)들을 이용하여 식물병을 방제하는 연구가 활발히 진행되어 여러 가지 rhizobacteria가 상품화되어 가고 있고 그 효능도 실제 포장에서 확인되었다 (Kloepper et al. 1980; Kloepper et al. 1992; van Loon et al. 1998; Wei et al. 1996). 이러한 식물근권 세균들은 주로 뿌리 주위에서 서식하지만 그들이 존재하지 않는 잎에 발생하는 병의 감소까지 가져오는 전신적 병 저항성을 유도하는 능력이 있다 (Glick and Bashan 1997; O'Sullivan and O'Gara 1991). 지금까지 연구된 바에 의하면 이러한 rhizobacteria의 접종에 의해, 작물에서 발생하는 곰팡이병, 세균병, 바이러스병 뿐만 아니라 곤충 및 선충에 의한 피해도 줄일 수 있었다 (Rmamootty et al. 2000; van Loon et al. 1998; Wei et al. 1996). Rhizobacteria에 의해 유도되는 병 저항성은 broad spectrum을 가지고 있어서 한가지 rhizobacterium의 식물체 정착이 여러 종류의 병원균에 의한 피해로부터 식물을 보호하는 경우가 일반적이다. 그 대표적인 예로 토양에서 분리된 rhizobacteria의 하나인 *Pseudomonas fluorescens* 89B-27을 오이 종자에 처리하였을 때 오이에 발생하는 탄저병, 세균성 점무늬병, CMV 바이러스병 뿐만 아니라 해충 피해 방제에 효과적이었다는 보고가 있다 (Rmamootty et al. 2000; van Loon et al. 1998; Wei et al. 1996).

그러나, 이러한 rhizobacteria에 의해 유도되는 병 저항성 기작에 관한 연구는 아주 미흡한 실정이다. Rhizobacteria를 처리한 강낭콩에서는 식물의 세포벽이 lignin화되었고 토마토에서는 *Fusarium* wilt를 일으키는 병원균이 침입하는 부위의 식물 세포벽이 두꺼워졌다 (Hammerschmidt and Kur 1982; Ryu et al. 2000; Zodr and Anderson 1992). 그러나 일반적으로 다른 rhizobacteria의 접종에 의해서는 이러한 물질들의 집적이 일어나지 않아 pathogenesis-related proteins이나 phenolic compounds이외의 다른 화합물이 rhizobacteria에 의한 유도 저항성에 관련되어 있을 것이라는 견해가 지배적이

다 (Hoffland et al. 1995; Pieterse et al. 1996; van Loon et al. 1998). Rhizobacteria에 의해 유도되는 병 저항성은 병원균에 의해 유도되는 저항성과는 달리 PR 단백질들의 발현이 유도되지 않고 SA를 분해하는 효소를 가진 형질 전환 식물체(*nahG*)에서도 wild-type과 같은 수준의 저항성을 유도하는 것으로 보아 병원균에 의해 유도되는 병 저항성과는 다른 경로를 통해 병 저항성이 유도될 것으로 추정되고 있으나 (Pieterse et al. 1996; van Loon et al. 1998) 아직 정확한 작용 기작이나 경로는 물론 어떤 유전자들이 유도되는지에 대한 연구도 전무한 실정이다.

병 저항성을 유도하는 rhizobacteria의 전신저항성의 유도요인에 대한 연구는 주로 돌연변이주의 선발에 의해 수행되었는데 지금까지 rhizobacteria가 가지고 있는 병 저항성 유도인자들은 세균이 생산하는 lipopolysaccharide (LPS), exopolysaccharide(EPS), siderophore, salicylic acid (SA)등으로 알려졌다 (de Weger et al. 1987; Neilands et al. 1986; Park et al. 2000; Rmamootty et al. 2000; van Loon et al. 1998). 그러나 아직까지 이에 관한 연구는 초보단계로 어떤 병 저항성 결정인자들이 어떤 작용 기작에 의해 병 저항성을 유도하는지에 관한 구체적인 실험이 수행된 것이 없고, 이들 유전자를 클로닝하는 시도조차 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 rhizobacteria의 유도 저항성에 관련된 유전자들을 식물 병 방제에 응용하는 최초의 시도이다.

미생물의 식물뿌리 정착능력은 많은 식물-미생물 상호작용에서 아주 중요한 factor로, rhizobacteria를 실제로 포장에서 사용하고자 하였을 때 가장 문제가 되는 점 중의 하나이다 (Glick and Bashan 1997). Rhizobacteria를 포장에 사용하고 그들의 능력을 증가시키기 위해서 식물뿌리 정착에 관련된 연구나 이에 관련된 세균의 유용 유전자의 발현 및 특성을 밝히는 연구가 절실히 필요하다. 지금까지 연구된 바에 의하면 일반적으로  $10^5$  colony forming unit/g of root 농도 이상의 rhizobacteria가 뿌리에 존재하였을 때 식물 병 저항성이 유도되고 그 이하인 경우는 저항성이 유도되지 않아 병 저항성을 유도하는 rhizobacteria의 식물정착 능력이 아주 중요한 요인중의 하나로 작용하였다 (Liu et al. 1995; Rmamootty et al. 2000; van Loon et al. 1998).

본 연구에서는 식물에 병 저항성을 유도하는 균주인 *Pseudomonas chloraphis* O6균주와 오이를 이용하여 미생물과 식물에서 O6균주에 의한 유도 전신 저항성 (induced systemic resistance)에 관한 O6균 유래 병저항성 유도 인자를 밝히고 이를 조절하는 global regulator를 찾아서 미생물 유래 병저항성 유도 인자의 조절 기작을 밝히고자 하였다. 또한 O6균주에 의해 유도되는 오이의 병 저항성 유도에 관련된 유전자들을 subtractive hybridization에 의해 분리하였고, 이들의 발현 양상을 여러 병원균의 접종이나 병 저항성 유도물질 을 처리하여 확인하였다. 또한 이들 O6균주 유래 병 저항성 유도에 관련된 유

진자와 O6균주에 의해 유도되는 병 저항성 관련 유전자들을 담배에 형질전환하여 병 저항성 유도를 검정함으로써 **rhizobacteria에 의해 유도되는 병 저항성 능력을 유전공학을 이용한 병 저항성 품종의 분자유종과 접목시키려고 하였다.** 또한 O6 균주가 식물 뿌리에 정착하는데 중요한 요인일 것으로 생각되는 오이 뿌리 분비액의 조성을 밝혔고, 이들 뿌리 분비액이용에 이상이 생긴 돌연변이주 분석을 통해 오이 뿌리 정착에 필요한 유전자를 찾았다. 이러한 결과를 바탕으로 *P. chlororaphis* O6균주를 제제화하는데 유기산등을 첨가하여 포장 실증연구를 수행하였고 병 방제 효과를 확인하였으며, **고기능 rhizobacteria의 성공적인 실용화를 위해 병 저항성 유도 결정인자의 발현을 증진시키는 물질을 규명함으로써 이들을 상품화할 수 있는 가능성을 탐색하고자 하였다.**

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

*P. chlororaphis* O6균주의 병 저항성 유도 인자 유전자 및 발현에 관련된 신호전달 체계 규명, O6 균주에 의해 유도되는 오이의 병 저항성 유도 유전자의 분석과 형질전환에 의한 병 저항성 유도 검정, 오이 뿌리 분비액의 조성 분석과 뿌리 분비액 이용에 관련된 유전자의 분석, O6균주의 제제화를 통한 포장 실증 효과 검정등을 연구한 본 과제외 세부 내용 및 범위를 요약하면 다음과 같다.

#### 1. 병 저항성 유도 능력이 상실된 rhizobacteria 돌연변이주의 선발 및 특성분석

Tn5를 이용하여 병 저항성을 유도하지 못하는 *P. chlororaphis* O6 돌연변이주들을 선발하고 각 돌연변이주들의 Tn5 flanking sequence를 확인하였다. 이들은 크게 3가지 그룹으로 구분이 가능하였다. 첫 번째 그룹으로는 GacS (global sensor kinase), Lon (Lon protease), 그리고 PPX (exopolyphosphatase) 유전자등 주로 세균에서 여러 유전자를 조절하는 global regulator로 작용하는 유전자들이 분리되었다. 두 번째 그룹으로는 여러 가지 transporter (ABC-type transporters, leucine transporter)와 secretion (translocase and HylD secretion protein) 관련 유전자들이 분리되었고, 3번째 그룹으로는 주로 기본 대사에 관련된 유전자 (fumarate hydratase and AIR synthase)들이 분리되었다. 그러나 내병성 유도 물질을 합성하는 구조 유전자들은 선발이 되지 않아, O6 균주의 병 저항성 유도 인자는 한 가지 인자가 아

나라, 여러 인자가 관여하는 것으로 추정되었다. 분리된 유전자들은 앞으로 O6 균주의 병 저항성 유도 인자를 연구하는 중요한 재료로 이용될 것이다.

## 2. *P. chlororaphis* O6균주의 phenazine 생합성 유전자 클로닝 및 기능 분석

O6균이 생산하는 phenazine 생합성 유전자를 클로닝하였고 돌연변이주를 이용하여 phenazine이 식물병 방제에 직접적으로 관련이 된다는 사실을 밝혔으며, phenazine은 세균의 농도가 일정 이상이 되는 late log phase에서 발현됨을 확인하였다. 또한 phenazine 생합성 유전자의 발현은 homoserine lactone을 생합성하는 *phzI* 유전자에 의해 조절되고, *phzI*는 *gacS*에 의해 조절됨을 확인하였다. *PhzI* 돌연변이주에서 식물 병저항성 유도 능력이 감소하여 아마도 O6균의 병 저항성 유도 능력이 *phzI* 유전자 산물인 homoserine lactone에 의해서 조절될 것으로 추정되었다.

## 3. *P. chlororaphis* O6의 내병성 유도에 있어서 GacS의 역할과 O6에 의해 유도되는 식물신호전달체계.

O6균의 sensor kinase인 GacS가 병 저항성 유도 능력에 관련되어 있는지를 담배의 무름병과 들불병에 대해 조사해 본 결과, 무름병에 대해서는 병 저항성을 유도하는데 GacS가 필수적이지만, 들불병에 대해서는 GacS 이외에 다른 신호전달 체계에 의해 조절됨을 밝혔다. 또한 O6에 의해 유도되는 식물의 병 저항성에는 ethylene 관련 신호전달 체계가 중요하게 작용함을 확인하였다.

## 4. *P. chlororaphis* O6 *gacS* 유전자의 stationary-phase sigma factor인 RpoS 조절기작 및 기능

O6균의 모든 유용한 형질들 (phenazine을 비롯한 2차 대사산물, 병 저항성 유도 능력)은 항상 O6균의 농도가 일정 이상이 되는 late log phase나 stationary-phase에 발현된다. 또한 O6균주의 병 저항성 유도에 필수적인 GacS의 발현도 stationary-phase에서 가장 높았다. Stationary-phase에서 유도되는 유전자들은 주로 RNA polymerase의 sigma factor인 RpoS에 의해 조절되었고 GacS가 RpoS를 조절하여 병 저항성 유도 능력을 조절하는 가능성이 타진되었다. GacS 돌연변이주에서 *rpoS* 유전자의 발현이 감소하여 oxidative stress에 대한 내성이 현저히 감소하였으나, RpoS 돌연변이주는 병 저항성 유도 능력이 wild-type과 비슷하기 때문에 *rpoS* 유전자가 GacS에 의해 조절되

지만 O6균주의 병 저항성 유도 능력과는 관련이 없음을 밝혔다.

#### 5. O6균주의 생물적 방제 능력을 조절하는 global regulator로서의 GacS와 Lon protease의 역할

*P. chlororaphis* O6균주에서 late log phase와 stationary phase에 발현되는 sensor kinase인 GacS와 Lon protease가 O6 균주가 지니고 있는 여러 유용형질들(phenazine 생성, 병 저항성 유도)을 조절하는 주 조절자임을 밝히기 위해 각각의 돌연변이주를 조제하였다. GacS와 Lon protease가 발현되지 못하면 식물병 저항성 유도 능력이 상실되었고, 여러 2차 대사 산물들을 생산하지 못하여 GacS와 Lon protease가 병 저항성 유도 능력과 이차대사 산물의 생산을 조절하는 global regulator임을 밝혔다.

#### 6. 오이 뿌리 분비액 조성 및 뿌리 분비액 이용에 관련된 O6균주의 유전자 분리

O6균주의 뿌리 정착에 중요한 영양분으로 작용하는 뿌리 분비액 중 탄소원으로서 당보다 유기산의 농도가 10배 이상 높게 나타났다. 또한 오이 뿌리 분비액 이용에 이상이 생긴 돌연변이주들을 분리하여 분석한 결과, *mce* (mycobacterial cell entry) 유전자와 aminoimidazole ribonucleotide synthase (AIR synthase)가 오이 뿌리 분비액 이용에 관련됨을 확인하였다. 따라서 O6균주가 오이 뿌리 정착을 위해서는 유기산을 잘 이용할 수 있어야 하며, 또한 purine 생합성 능력 등이 매우 중요한 선결 조건임을 밝혔다.

#### 7. O6 균주의 유기산 흡수 관련 유전자인 *dctA*의 발현조절 및 기능 분석

오이 뿌리 분비액 중 유기산의 농도가 당 농도보다 약 10배 이상 높게 나타나, O6균주에서 유기산 흡수에 관련된 *dctA* 유전자의 발현 양상과 병 저항성 유도 능력과의 관련성을 조사하였다. DctA는 여러 유기산의 첨가에 의해 발현이 유도되고, 당의 첨가에 의해서는 발현이 감소되는 유기산 transporter로서 여러 가지 유기산의 흡수에 관련이 있었고, DctA 돌연변이주는 유기산만을 탄소원으로 해서는 생육하지 못하였다. DctA 돌연변이주의 phenazine 생성 능력과 식물 병원균 억제 능력은 wild-type과 차이가 없었으나, 병 저항성 유도 능력이 wild-type에 비해 감소하였다. 이러한 결과는 오이 뿌리 분비액 중 유기산이 O6균주의 병 저항성 유도 능력에 직·간접적으로 영향을 주고 있고, O6균주의 유기산 이용 능력이 유용 형질 발현에 중요한 요인임을 시사하고 있다.



## 8. 오이에서 O6균주 의해 유도 발현되는 유전자의 클로닝 및 특성분석

*Pseudomonas chlororaphis* O6 균주의 접종에 의해 유도 발현되는 오이 유전자들을 얻고자 하였다. Subtractive hybridization에 의해 O6균을 처리하였을 때 대조구보다 빠르게 증폭 발현되는 많은 유전자들을 클로닝하였으며 이들의 발현양상을 비교 분석하였다. Northern hybridization에 의해 확인해 본 결과, O6균을 처리한 다음 갈반병균을 처리한 식물체에서는 O6균을 처리하지 않고 병원균만을 처리한 구에 비해 이들 유전자들이 약 12시간에서 24시간 정도 더 빠르게 증폭 발현되는 양상 (priming 효과)을 보였다. 한편, 흥미롭게도 유도 발현된 cDNA들의 기능을 보면 defense signal transduction에 관련될 것으로 추정되는 protein kinase, leucine rich repeat protein kinase, hypersensitive-induced reaction protein, signal recognition particle receptor, receptor-like kinase Xa21-binding protein 등을 포함한 다양한 cellular function을 갖는 유전자들을 얻을 수 있었다.

## 9. O6균주 및 오이 유래 병 저항성 유도 유전자의 실용화 및 담배 형질전환

O6균주에서 병 저항성 유도에 관련될 것으로 추정되는 homoserine lactone을 합성하는 *phzI* 유전자와 ethylene의 전구물질을 분해하는 ACC deaminase 유전자들을 담배에 형질 전환하였다. 또한 subtractive hybridization에 의해 선발된 오이 유전자 pool에서 O6균주에 의해 가장 빠르고 강하게 증폭발현이 이루어졌던 *CsGolS2* 유전자를 담배에 형질전환하여 병 저항성을 제고하는 능력이 있음을 확인하였다. *CsGolS2* 유전자를 형질전환한 담배는 무름병균에 대해 병 저항성 유도 능력이 확인되었으나, *PhzI*를 형질전환한 담배에서는 무름병에 대한 병 저항성 유도 능력이 보이지 않았다. O6균주에 의해 빠르고 강하게 발현이 유도된 *CsGolS2* 유전자는 다른 작물에 병 저항성 유도를 위한 중요한 재료로 이용될 가능성을 확인하였다.

## 10. *P. chlororaphis* O6균주의 제제화 및 포장 실증

O6균주의 유기산 이용 능력이 병 저항성 유도 능력에 중요한 요인임이 밝혀져 유기산이 첨가된 배지에서 *P. chlororaphis*을 생육시켜 오팜-가드라는 상표명으로 제제화하였다. 제제화된 오팜-가드를 실제 농가에서 실증 실험을 실시하여 본 결과, 고추 청고병, 멜론의 병 방제 효과와 딸기, 오이, 호박 모잘록병등의 식물병 예방 효과가 뛰어난을 확인하였으며 앞으로 지속적으로 많은 작물과 병해에 대한 식물병 저항성 및 예방제로서 가능성을 검토할 것이

다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. 육종학자와 연계된 추가 연구의 필요성

본 연구에서 얻어진 미생물 유래 병 저항성 유도 관련 유전자와 O6 균주의 처리에 의해 유도된 식물 유래 병 저항성 유도 관련 유전자들을 활용하기 위하여 다른 작물 특히 벼에 응용할 계획이다. 현재까지의 연구 결과로 볼 때 이러한 유전자들이 다른 작물에서도 병 저항성을 유도할 수 있는 능력을 보여줄 것으로 추정되며 현재 이들 유전자들을 벼에 형질전환하고 있는 중이다. 추후 3년간의 확장 연구를 통해 새로운 병 저항성 유전자들의 형질전환을 시도하여 봄으로서 여러 가지 병해에 저항성을 가지는 안정적인 벼 품종 개발이 가능하리라고 판단된다. 따라서 종묘회사 및 육종학자와 연계된 3년 동안의 추가 연구를 통하여 병 저항성 벼를 육성하는 연구가 필요하다.

##### 2. 포장 실험 확대의 필요성

본 연구에서 오팜-가드의 효과는 실험실과 온실에서 주로 이루어졌고 이를 농업 현장에서 이용하기 위해서는 더 많은 작물과 식물병해충에 대한 포장 실험이 필수적이다. 여러 가지 작물과 병해에 대한 포장 연구를 수행하기 위해서는 많은 시간이 요구되므로 추가 연구가 필요하다.

여 백

# Summary

## I . Title

Establishment of a plant disease control method using systemic resistance induced by rhizobacteria

## II . Importance and objectives of the research

Biological control of plant pathogens by microbes has several bases. The production of antimicrobial compounds that deter growth of the pathogen is one of the mechanisms. Phenazines produced by several plant-associated pseudomonads, *Pseudomonas chlororaphis* 30-84 (Pierson et al, 1998), *P. fluorescens* 2-79 (Thomashow and Weller, 1988), and *P. chlororaphis* P2E and O6 (Kropp et al, 1996; Radke et al, 1994), inhibit the growth of fungi, including plant pathogens. Field studies indicate that the phenazines are produced when the bacteria colonize plant roots and that they are important in biological control (Thomas, 1998; Thomashow et al, 1990). A second method of control of pathogens is by the induction of plant defenses. Differential expression of defense genes is controlled through two pathways, the salicylic acid (SA) or the jasmonic acid (JA)/ethylene pathway (Delaney et al, 1994; Heil and Bostock, 2002). Enhanced expression from the promoter of the PR-1 gene, associated with the SA pathway, is observed in plants with root colonization by bacilli and pseudomonads (Park and Kloepper, 2000; Zdor and Anderson, 1992). In contrast, the induced systemic resistance (ISR) caused by colonization by a *P. fluorescens* isolate is SA-independent but requires the JA/ethylene pathway (Pieterse et al, 1998)].

A large number of rhizobacteria are present on the surface of plant root where nutrients are provided by plant exudates. Increased plant productivity often results from the suppression of plant pathogens through

induction of systemic disease resistance by root colonization with certain strains of non-pathogenic rhizobacteria. The rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) is demonstrated against fungi, bacteria, and viruses in various plant species in which the rhizobacteria and the challenging pathogen are spatially separated (van Loon et al., 1998). Rhizobacterial strains differ in their ability to cause ISR in different plant species (van Loon et al., 1998). The ISR may be involve signaling pathways in which jasmonic acid and ethylene play key roles (Pieterse et al., 1998), or may be associated with the salicylic acid-dependent pathway, being related with enhanced expression of PR-1a gene (Park and Kloepper, 2000). Rhizobacterial strains may cause resistance to abiotic stresses in plants. In *Arabidopsis thaliana*, root colonization by *Paenibacillus polymyxa* induced resistance to drought and challenge by *Erwinia carotovora* (Timmusk and Wagner, 1999). Transcripts of a gene responding to desiccation stress, *ERD15*, accumulate in these plants (Timmusk and Wagner, 1999).

Colonization of tobacco roots by *P. chlororaphis* O6 caused induced systemic resistance effective against to two foliar bacterial pathogens, the wild fire pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *tabacci* and *Erwinia cartotovora* subsp. *carotovora*, a soft rot (Spencer et al., 2003). Expression of defense-related genes such as *PR1-g*, *HMGR* and *LOX* was induced in leaves of plants by root colonization of O6 without pathogen infection (Spencer et al., 2003).

The rhizobacteria-mediated induced systemic resistance possess a great potential to development of new means of controlling of plant disease or commercialization. However, microbial determinants of rhizobacteria involving induced systemic resistance and plant ISR genes induced by rhizobacteria are largely unidentified. In this work, we used *P. chlororaphis* O6 and cucumber as model rhizobacterium and model plant. We have three main approaches to development ISR to use control plant disease. 1) We isolated the gene encoding microbial determinants or regulatory proteins for ISR activity of *P. chlororaphis* using Tn5 mutagenesis. Expression of the isolated genes were analyzed by RT-PCR and the functions of the genes related ISR activity or biological activity were determined by analysis of

the knock out mutant. 2) We isolated cucumber genes related ISR, which induced by colonization of *P. chlororaphis* O6, by subtractive hybridization. The ISR-related cucumber genes were over-expressed in tobacco to investigate the role of the isolated genes in induced disease resistance. The microbial determinant genes related ISR were also over-expressed to see induction of disease resistance in tobacco. 3) We analyzed composition of cucumber root exudates and isolated the O6 mutants that are deficient utilization of cucumber root exudates as nutrients. These results were used to formulate *P. chlororaphis* O6 to use a biopesticide (Ofam-guard™) and the commercial product of the O6 was tested its disease control efficacy against various plant diseases in various crop plants.

### III. Research content and scope

#### RESULTS AND DISCUSSION

##### 1. Biological and induced systemic resistance activity of *Pseudomonas chlororaphis* O6

*Pseudomonas chlororaphis* O6 was capable to induce systemic resistance against *Cucumber mosaic virus*, tobacco soft rot and wild fire disease in tobacco, and against target leaf spot disease in cucumber. O6 strain also produced several secondary metabolites including phenazines involved in inhibition of phytopathogenic fungal growth.

##### 2. Isolation of *P. chlororaphis* O6 mutants lacking induced systemic resistance.

To investigate the genes involved in induced systemic resistance of *P. chlororaphis* O6, Tn5 mutants lacked ISR activity were isolated and Tn5 flanking sequences of the mutants were analyzed. The global regulators, including a sensor kinase GacS, Lon protease, and exopolyphosphatase were mutated in ISR-deficient mutants. Several secretory genes, including HyID

secretion protein and translocase SecB, were also mutated in ISR-deficient mutants. The genes involved in metabolism, such as fumarate hydratase and AIR synthase, were isolated during analysis of ISR-deficient mutants. These results indicated that microbial determinants involving in induced systemic resistance of *P. chlororaphis* O6 may be very complicated, regulated by GacS and Lon protease, and may be involved more than one compounds.

### 3. Role of phenazine in *Pseudomonas chlororaphis* O6 on biocontrol and induced systemic resistance activity.

The genes encoding phenazine biosynthetic genes of *P. chlororaphis* O6 were cloned and mutated to exploit the role of phenazine in biocontrol and ISR activity. The phenazine operon consisted of *phzABCDEFG* genes and a *phzI/phzR* two component system which showed high homology *luxI/luxR* family of quorum sensing regulators. Expression of *phzI* and *phzA* was observed only in late-log phase and stationary phase. Expression of *phzI* and *phzA* in the *gacS* mutant were reduced through out growth phases compared to the wild-type. The *phzI* and *phzA* mutant were found to be deficient in the production of phenazines. Induced systemic resistance activity of *phzI* mutant was decreased compared to that of wild-type. These results indicated that *phzI* gene of *P. chlororaphis* O6 is responsible for the production of a HSL required for phenazine antibiotic production and may be involved in induced systemic resistance.

### 4. Induced defence in tobacco by *Pseudomonas chlororaphis* O6 involves at least the ethylene pathway

The antifungal phenazines produced by certain root colonizing pseudomonads are credited with contributing to the biocontrol activity of these isolates. However, the phenazine producer *Pseudomonas chlororaphis* O6 also induces systemic resistance in tobacco. Protection against two foliar bacterial pathogens, the wild fire pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that causes a soft rot, was observed. A mutation in the bacterial global regulator *gacS* gene

eliminated certain secondary traits, including phenazine production, but did not prevent induction of resistance in tobacco to *P. syringae* pv. *tabaci*. However, induction of resistance to *E. carotovora* subsp. *carotovora* was impaired in plants colonized by the GacS mutant compared to the level of protection in plants colonized by wild-type *P. chlororaphis* O6. Colonization by both the wild-type and the GacS mutant caused increased accumulation for transcripts of plant defense genes regulated by ethylene. Tobacco transformed with a mutant *etr1* gene to reduce ethylene sensitivity did not display induced resistance to *E. carotovora* when colonized by *P. chlororaphis* O6. We conclude that inducers other than phenazines appear to initiate the pathways for systemic resistance induced by *P. chlororaphis* O6.

5. The global regulator GacS of a biocontrol bacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6 regulates transcription from the *rpoS* gene encoding a stationary-phase sigma factor and affects survival in oxidative stress

The global regulator, GacS (global activator for antibiotics and cyanide sensor kinase), of the rhizosphere bacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6 was required for increased resistance to hydrogen peroxide as cultures mature. Specific bands of peroxidase and catalase activity were absent in the stationary-phase cells of the O6 *gacS* mutant, whereas a manganese superoxide dismutase (MnSOD) isozyme was expressed earlier and to a greater extent than in the wild-type. In the wild-type cell, transcript accumulation of *rpoS* was higher in late logarithmic (log)-phase cells than cells from mid log-phase or stationary-phase. Transcript abundance from *rpoS* was reduced in the *gacS* mutant throughout the growth phase compared to the wild-type expression. The sequence of a small RNA, *rsmZ*, found downstream of *rpoS* in other pseudomonads was lacking in O6. This RNA is implicated in the control of genes activated by the GacS system. Thus, the mechanism by which GacS mediates the activation of genes under its control requires further investigation in O6.

6. The global regulator GacS of *Pseudomonas chlororaphis* O6, positively regulated phenazine production, negatively regulated IAA biosynthetic gene.



A root-associating bacterium, *Pseudomonas chlororaphis* O6, sensor kinase (GacS) senses a still-unknown signal and activates, via a phosphorelay mechanism, the GacA transcription regulator, which in turn triggers the expression of target genes. The GacS deficient O6 did not produce the phenazine, protease, and homoserin lactone. The ability to inhibit fungal pathogens of O6 was abolished in GacS mutant. However, in the GacS mutant, production of siderophore was much more than that of wild-type. To investigate the GacS-mediated signal transduction pathway involved in production of phenazine, we cloned the *phz* operon. Transcripts from *phzI* encoding acylhomoserine lactone (AHL) synthase, and *phz* structural genes in the wild-type were analyzed by RT-PCR. The *phzI/A* transcribed levels of wild-type in mid and late log-phase cells were much the same, but the *phzI/A* in stationary-phase were increased about five and three times respectively. Many plant-associated bacteria synthesize the phytohormones, such as auxins. Production of the auxin indole acetic acid (IAA) not synthesize in the wild-type, while the GacS mutant increased the level of IAA in tryptophan-supplemented medium. However, sensor kinase *gacS* gene in *Pc* O6 is not essential for plant root colonization. These results indicate that the GacS global regulatory system positively controls phenazine production at multiple levels, but on the other hand it negatively regulates IAA biosynthetic gene.

#### 7. Lon protease gene of *Pseudomonas chlororaphis* O6 involved in production of secondary metabolites and regulated IAA biosynthetic gene.

The flanking sequence of the N7 mutant showed high homology with *lon*, which encodes an ATP-dependent protease found in diverse organisms, including bacteria, plants, and animals. The deduced amino acid sequences of the Tn5-flanking region are 90% identical to the ATP-dependent protease of *P. aeruginosa* PAO1. To investigate the role of Lon protease on biological properties of O6, we isolated Lon mutants by marker exchange mutagenesis. The Lon mutants did not produce phenazines, protease, and siderophore. They lost their ability to inhibit the fungal pathogens and did not produce homoserin lacton (HSL) which is known as a signal molecule for induction of secondary metabolites.

Production of the auxin indole acetic acid (IAA) not synthesized in the wild-type, while the Lon mutant increased the level of IAA in tryptophan-supplemented medium. Our results showed that Lon protease of *P. chlororaphis* O6 may be one of the global regulators in production of secondary metabolites and homoserin-lactone as well as indole acetic acid.

#### 8. Isolation of *Pseudomonas chlororaphis* O6 mutants altered in growth on cucumber root exudates

Root colonization can be crucial for the action of microbial inoculants used as biocontrol agents. Root exudates are major carbon and energy source for colonizing microorganism for expression of biological activity. We determined the sugar and organic acids compositions of cucumber root exudates and isolated Tn5 mutants altered in growth on the cucumber root exudates. The major organic acids were fumaric acid, malic acid, benzoic acid and succinic acid, and glucose and fructose were major monosaccharides in cucumber root exudates. The total amount of organic acids was ten times higher than that of sugars. To determine the genes involved in utilization of cucumber root exudates, we selected three Tn5 mutants showing altered growth on cucumber exudates. The growth of one mutant, H10 was faster, but one mutant, D1 was slower than growth of wild type. However, C2 mutant did not grow on cucumber root exudates. The Tn5 flanking sequence analysis showed that a AIR synthase gene in C2 mutant and a gene containing a mce (mycobacterial cell entry) domain in D1 mutant were mutated. Our works will open opportunities for identification of bacterial traits that are involved in utilization of root exudates and that may be important in expression of biocontrol activity.

#### 9. Transcriptional regulation and mutational analysis of a *dctA* gene encoding an organic acid transporter protein from *Pseudomonas chlororaphis* O6

A *dctA* gene encoding a protein with identity to a C4-dicarboxylic acid/H<sup>+</sup> symporter was cloned from a beneficial root colonizer, *P. chlororaphis* O6. Expression of the *dctA* gene was induced in minimal

medium by several organic acids and was repressed by glucose. Highest expression was observed in early-logarithmic (log) cells grown on fumarate, acetate, or succinate with decline as cells approached late-log growth phase. The *dctA* transcript accumulated weakly when cells were grown on malate but strong expression was observed with benzoate. Expression of the *dctA* transcript was repressed in early-log cells upon addition of glucose to fumarate, but was detected as the cell culture aged.

#### 10. Mutational analysis of *dctA* gene of *Pseudomonas chlororaphis* O6.

To investigate the role of *dctA* gene in biocontrol activity and induced systemic resistance of *P. chlororaphis* O6, a *dctA*-deficient mutant, constructed by marker exchange mutagenesis, did not grow on minimal medium containing succinate, benzoate, acetate or fumarate, and growth on malate was delayed. The *dctA* mutant and wild-type grew equally on citrate, glucose, fructose, sucrose or inositol. We conclude that the transporter protein encoded by *dctA* is essential for utilization of certain organic acids and its expression is controlled by the availability of sugars. The colonization ability of *dctA* mutant on cucumber roots was decreased compared to wild-type and ISR activity of *dctA* mutant against target leaf spot disease greatly decreased, but production of phenazine and inhibition of phytopathogenic fungi were same level as wild-type. These results indicated utilization of organic acid and *dctA* gene in *P. chlororaphis* O6 is an important factor on root colonization and expression of induced systemic resistance, but not in expression of secondary metabolites involved in biocontrol activity.

#### 11. Gene expression analysis in cucumber leaves primed by root colonization with *Pseudomonas chlororaphis* O6 upon challenge-inoculation with *Corynespora cassiicola*.

Root colonization of *Pseudomonas chlororaphis* O6, a nonpathogenic rhizobacterium, induced systemic resistance in cucumber plants against target leaf spot caused by *Corynespora cassiicola*. A cDNA library was

constructed using mRNA extracted from cucumber leaves 12 h after inoculation with *C. cassiicola*, using plants colonized by O6. To identify the genes involved in the O6-mediated induced systemic resistance (ISR), we employed a subtractive hybridization method using mRNA extracted from pathogen-challenged cucumber leaves of plants lacking colonization. Differential screening of the cDNA library led to the isolation of six distinct genes encoding a GTP-binding protein, a 60S ribosomal protein, a hypersensitive-induced reaction protein, an ubiquitin extension protein, a pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase and a signal recognition particle receptor. Expression of these genes was not induced by O6-colonization alone. Rather transcript accumulation of these genes increased significantly faster and stronger in the O6-colonized than in non-colonized plants after challenge infection. Therefore, O6-mediated ISR may be associated with an enhanced capacity for the rapid and effective activation of cellular defense responses after challenge inoculation.

12. Characterization and construction of transgenic tobacco plants over-expressed CsGolS that is induced by *P. chlororaphis* O6.

A CsGolS cucumber gene is induced faster and stronger in the O6-colonized than in non-colonized cucumber. To further investigate role of the CsGolS in disease resistance, the expression of CsGolS was examined after treatment of a bacterial pathogen or chemicals that are involved in disease resistance in plants. The CsGolS transcript were greatly induced upon treatment on pathogen treatment and chemical treatments. This result implicates that CsGolS could be a excellent candidate gene for enhancement or induce disease resistance. Therefore, the CsGolS was over-expressed in tobacco, and the transgenic lines of the CsGolS were enhanced disease resistance against soft-rot disease. These results indicate that the cucumber genes induced by *P. chlororaphis* O6 could be very useful resource to develop new disease resistance approach in plant.

13. Construction of transgenic tobacco plants over-expressed microbial genes of *P. chlororaphis* O6.

Homoserine lactone regulate diverse biological functions including the induction of virulence gene of plant pathogenic bacteria. It is possible that plant bacterial disease could be control by manipulating expression of homoserine lactone or degrading homoserine lactone. *P. chlororaphis* O6 produces ACC deaminase that is hydrolyzed ACC, a precursor of plant hormone ethylene. A *phzI*, encoding HSL synthase involved in regulating of *phz* genes, and a *acd*, encoding ACC deaminase involved in hydrolysis of ACC, were transformed into tobacco to investigate the role of these genes in induction of disease resistance by microbial genes. We are currently under investigation of disease resistance of transgenic tobacco plants with *E. carotovora* subsp. *carotovora*

#### 14. Formulation of *P. chlororaphis* O6 and field test against various plant diseases.

Based on composition of cucumber root exudates and mutant analysis, we were added key nutrients to help root colonization on plant roots and named Ofam-guard™. This formulated product showed great disease control activity against various plant diseases and showed primed effect on various crop. The efficacy of this product will be extended in varous plant species and plant disease, and will be enhanced by modification with mixture of other beneficial microbes or chemicals.

# CONTENTS

Chapter 1. Outlines of Research .....	29
Section 1. Purposes and aims of research .....	31
1. Purpose .....	31
2. Aims .....	32
Section 2. Specific aims and description of research .....	34
1. Specific aims and description of research .....	34
2. Methods and strategies .....	36
Chapter 2. Current status of related research developed in Korea and other .....	49
Section 1. Related research status in foreign countries .....	51
Section 2. Related research status in Korea .....	54
Chapter 3. Results of research .....	57
1. Biological and induced systemic resistance activity of <i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6 .....	59
2. Isolation of <i>P. chlororaphis</i> O6 mutants lacking induced systemic resistance .....	70
3. Role of phenazine in <i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6 on biocontrol and induced systemic resistance activity .....	84
4. Induced defence in tobacco by <i>Pseudomonas chlororaphis</i> strain O6 involves at least the ethylene pathway .....	102
5. The global regulator GacS of a biocontrol bacterium <i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6 regulates transcription from the <i>rpoS</i> gene encoding a stationary-phase sigma factor and affects survival in oxidative stress .....	121
6. The global regulator GacS of <i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6, positively regulated phenazine production, negatively regulated IAA biosynthetic gene .....	135

7. Lon protease gene of <i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6 involved in production of secondary metabolites and regulated IAA biosynthetic gene .....	146
8. Isolation of <i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6 mutants altered in growth on cucumber root exudates .....	161
9. Transcriptional regulation and mutational analysis of a <i>dctA</i> gene encoding an organic acid transporter protein from <i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6 .....	187
10. Mutational analysis of <i>dctA</i> gene of <i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6 .....	201
11. Gene expression analysis in cucumber leaves primed by root colonization with <i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6 upon challenge-inoculation with <i>Corynespora cassiicola</i> .....	210
12. Expression of CsGolS encoding galactinol synthase of cucumber, is induced by priming effect of <i>P. chlororaphis</i> O6, upon pathogen treatments and various chemicals, are involved in disease resistance .....	218
13. Construction and characterization of transgenic tobacco plants over-expressed CsGolS that is induced by <i>P. chlororaphis</i> O6 .....	226
14. Construction of transgenic tobacco plants over-expressed microbial genes of <i>P. chlororaphis</i> O6 .....	233
15. Formulation of <i>P. chlororaphis</i> O6 and field test against various plant diseases .....	239
Chapter 4. Achievements of aims and contribution to related areas .....	245
1. Achievements of research aims .....	247
1.1. Aims, evaluation scores and achievements of the first year research .....	247
1.2. Aims, evaluation scores and achievements of the second year research .....	248
1.3. Aims, evaluation scores and achievements of	

the third year research .....	249
1.4. Overall evaluation on achievements of the research .....	249
2. Contribution to related areas .....	250
2.1. Technical aspects .....	251
2.2. Academic aspects .....	251
2.3. Economical and industrial aspects .....	254
Chapter 5. Application of results .....	257
1. Necessity of continuing researches .....	259
1.1. Necessity of continuing researches collaborating with plant breeders .....	259
1.2. Application in experimental station .....	259
2. Application of results in other researches .....	260
2.1. Microbial determinants and priming related genes ....	260
2.2. Plant growth regulator of O6 .....	260
3. Industrialization .....	260
Chapter 6. Information collected from aboard during the research period .....	261
1. Information on induced systemic resistance .....	263
2. Information on construction of disease resistance crop .....	263
3. Information on ISR induced microorganisms .....	264
Chapter 7. References .....	265



# 여 백

# 목 차

제 1 장 연구개발의 개요 .....	29
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성 .....	31
1. 연구개발의 목적 .....	31
2. 연구개발의 필요성 .....	32
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용 .....	34
1. 연구개발 목표와 내용 .....	34
2. 연구개발 방법 및 설계 .....	36
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	49
제 1 절 국외 관련 기술의 현황 .....	51
제 2 절 국내 관련 기술의 현황 .....	54
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	57
제 1 절 토양서식균 <i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6의 식물병원균 억제 능력 및 식물병 전신저항성 유도능력 .....	59
제 2 절 Tn5 돌연변이에 의한 <i>P. chlororaphis</i> O6균주의 induced systemic resistance (ISR) 유도 능력 상실 돌연변이주 선발 및 특성 분석 .....	70
제 3 절 <i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6균주의 phenazien 생합성 유 전자의 클로닝 및 돌연변이 분석 .....	84
제 4 절 <i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6의 내병성 유도 능력 생산에 있어서 GacS의 역할과 O6에 의해 유도되는 식물신호전달 체계 .....	102
제 5 절 <i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6에 의해 조절되는 stationary-phase sigma factor <i>rpoS</i> 의 전사조절 및 산화스트레스에서의 생존의 영향 .....	121
제 6 절 <i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6 균주의 sensor kinase인 GacS가 생물적 방제에 관련된 유전자들을 조절하는 global regulator .....	135

제 7 절	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6균주의 Lon protease가 생물 적 방제에 관련된 유전자들의 발현을 조절하는 global regulator .....	146
제 8 절	Tn5돌연변이에 의한 오이 뿌리 분비액 이용 돌연변이주 선발 .....	161
제 9 절	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6에서 유기산 흡수 transporter 인 <i>dctA</i> 유전자의 전사조절 및 돌연변이 분석 .....	187
제 10 절	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6의 유기산 흡수에 관련된 <i>dctA</i> 유전자의 돌연변이주 분석 .....	201
제 11 절	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6의 뿌리 정착에 의해 갈반병 균 <i>Corynespora cassiicola</i> 에 의해 유도되는 병 저항성 유도 에 관련된 오이 유전자의 분석 .....	210
제 12 절	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6에 의해 유도되는 galactinol synthase ( <i>CsGolS</i> ) 유전자의 발현 특성 규명 .....	218
제 13 절	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6균주에 의해 유도되는 병 저항성 유도 유전자 <i>CsGolS</i> 의 형질전환 및 병 저항성 유도 능력 .....	226
제 14 절	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6의 식물병 저항성 유도에 관련된 microbial determinants 유전자들의 담배 형질전환 및 병 저항성 유도 능력 .....	233
제 15 절	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6균주의 제제화 및 실용화 실증 실험 .....	239
제 4 장	목표 달성 및 관련분야에의 기여도 .....	245
제 1 절	목표 달성도 .....	247
1.	제 1 차년도의 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도 .....	247
2.	제 2 차년도의 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도 .....	248
3.	제 3 차년도의 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도 .....	249
4.	최종평가의 착안점 및 달성도 .....	249

제 2 절	관련분야에의 기여도 .....	250
1.	기술적 측면에서의 기여도 .....	251
2.	학문발전에의 기여도 .....	251
3.	경제, 산업화 측면에서의 기여도 .....	254
제 5 장	연구개발의 활용계획 .....	257
제 1 절	추가 연구의 필요성 .....	259
1.	육종학자와 연계된 추가 연구의 필요성 .....	259
2.	포장실험으로 확대의 필요성 .....	259
제 2 절	타 연구에의 응용 .....	260
1.	O6균주의 유도 물질 및 식물병 저항성 유도 유전자의 응용 .....	260
2.	O6균주의 식물생장조절물질의 응용 .....	260
제 3 절	기업화 추진 방안 .....	260
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정도 .....	261
제 1 절	Induced systemic resistance에 대한 기술정보 .....	263
제 2 절	병저항성 작물 생산을 위한 기술정보 .....	263
제 3 절	병저항성 유도 미생물 관련 기술정보 .....	264
제 7 장	참고문헌 .....	265

여 백

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

여 백

# 제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

## 1. 연구개발의 목적

급속한 산업의 발달과 지구 환경의 오염은 생태계의 파괴 등을 야기시키고 작물의 생산성을 감소시키는 주요 원인이 된다. 생물적 혹은 비생물적 원인에 의한 환경의 악화는 농작물의 성장 과정에서 치명적인 스트레스 인자로 작용함으로써 작물이 지닌 유전적 생산력을 20% 이하로 제한한다고 알려져 있다. 병해충등 생물적 스트레스를 극복하기 위해 신농약이나 고전 육종에 의한 새로운 품종들이 개발되어 농업 생산성의 증대에 많은 공헌을 하여 왔으나 화학적 방제에 따른 환경의 오염과 고전적 육종법이 지니는 한계성으로 인하여 유전자 조작과 고전 육종의 접목을 통한 병 저항성 품종 육성이 절실히 요구되고 있다. **작물에 발생하는 병해에 의한 피해는 세계적으로 220조원에 달할 만큼 경제적으로 엄청난 손실을 줄 뿐 아니라, 이를 방제하기 위한 농약의 과다 사용은 환경오염 및 인축독성 문제를 야기하여 결과적으로 농업을 총체적인 위기에 빠뜨리고 있다.** 농약을 사용하지 않은 고품질 저가 작물에 대한 요구도가 높아지고 있는 현 시점에서 농가 소득증대와 소비자의 요구를 모두 충족할 수 있는 방법으로 **환경 친화적인 농법의 개발이 유일한 대안**으로 부상하고 있다.

몇몇 rhizobacteria는 여러 가지 유용형질을 지니고 있는 미래의 친환경 식물병 방제의 주 재료로 이용될 수 있는 가능성을 지닌 미생물이다. 이러한 rhizobacteria균주들은 식물병원균의 생육을 억제하는 항생물질이나 독소등을 분비하여 직접적으로 식물병을 방제할 뿐만 아니라 아직까지는 잘 알려지지 않은 기작에 의해 간접적으로 식물의 성장을 촉진할 뿐 아니라 **식물에 병 저항성을 유도하는 능력을 가지고 있다.** 이러한 Rhizobacteria에 의해 유도되는 식물병 저항성 유도에 관련된 연구는 미비하여 rhizobacteria의 병 저항성 유도 인자나 이들 균주에 의해 유도되는 식물의 병 저항성 유도에 관련된 유전자들에 대한 연구가 전혀 이루어져 있지 않다. 또한 이러한 우수한 식물병 방제 능력을 가진 미생물을 이용하는데 가장 큰 문제점은, 실제 포장에 사용하였을 경우 근권 정착 능력이 떨어져 그들이 가진 유용형질을 제대로 발휘할 수 없거나 정착하였더라도 유용형질 발현의 변화에 의해 실용화가 어렵다는 점이다.

본 연구과제에서는 3년간의 연구를 통하여 rhizobacteria의 직접 사용에 의해 생기는 문제점들을 해결하기 위하여 **rhizobacteria에 의해 유도되는**



병 저항성 능력을 유전 공학을 이용한 병 저항성 품종의 분자유종과 접목 시키려고 하였다. 이를 위하여, 고기능 rhizobacteria의 병 저항성 유도에 관련된 식물 및 미생물 유래의 유전자들을 탐색하여 이들 유전자들이 병 저항성 형질전환 작물의 창출에 이용될 수 있는지를 규명하려고 하였다. 이와 더불어 고기능 rhizobacteria의 제제화를 통해 새로운 친환경 식물병 방제제를 개발하고자 하였다.

## 2. 연구개발의 필요성

### 가. 기술적 측면

식물에 병 저항성을 유도하는 *Pseudomonas chlororaphis* O6균주를 이용하여 이들 O6균주의 어떤 형질이 식물로 하여금 병 저항성이 유도되게끔 하는 지를 알아보았다. 또한 이들 병 저항성 유도 인자의 O6균주에서 발현 기작을 밝힘으로서 O6 균주 유래 병 저항성 유도 인자를 이용하여 병 저항성 유도 능력을 발휘하도록 하였다. 한편 이들 병 저항성 유도 인자들을 담배에 형질전환하여 병 저항성 유도 능력이 있는 지도 알아보려고 하였다. 또한 O6 균주에 의해 유도되는 오이의 병 저항성 관련 유전자를 담배에 형질전환하여 병 저항성 유도 및 방제 효과를 검증하고자 하였다. 뿐만 아니라 오이 뿌리 분비액 조성과 뿌리 분비액 이용 능력 유전자들의 분석을 통해 유기산이 첨가된 배지에서 생육시킨 O6균주를 제제화하여 실제 포장에서 여러 작물과 병해를 중심으로 병 저항성 유도 능력과 식물병 예방 능력을 발휘할 수 있는 상품화 가능성을 탐색하였다.

### 나. 경제·산업적 측면

병에 의한 식물의 피해가 세계적으로 200조원이 넘을 뿐만 아니라, 농약의 사용으로 인해 인체에도 영향을 미쳐 소비자와 농민들에게 동시에 경제적인 피해가 가중되고 있다. 이러한 피해와 문제점들을 해결할 수 있는 대안으로 본 연구팀에서는 rhizobacteria의 유도 저항성에 의한 환경친화적 식물 병 방제 기술을 연구하고자 한다. 이 방법이 확립되면 농약의 살포나 비료의 사용을 줄일 수 있어 경농비 감소 및 유기농법으로 인한 고소득이 보장되어 농민들에게 혜택이 돌아갈 뿐만 아니라, 소비자들에게도 농약을 사용하지 않은 국산 농산물의 섭취에 의해 건강을 지킬 수 있는 계기가 될 수 있을 것이다. 뿐만 아니라, 전세계적으로 유용한 유전자와 유용 미생물에 대한 특허출원의 시대가 도래하였다. 독자적으로 개발한 유용 유전자와 유용 미생

물들을 확보하는 일은 선진국과의 경쟁에서 생존을 위한 필수 조건이 되었을 뿐만 아니라, 농민의 소득증대를 위한 방안이 되기 때문에 국가차원에서 관심을 가져야 할 문제이다.

#### 다. 사회·문화적 측면

최근 생활수준의 향상으로 소비자들의 무공해 식품 선호가 일반화되고 있지만 농약이나 비료를 사용하지 않고 농산물의 생산을 현 수준으로 유지한다는 것은 거의 불가능한 것이 현실이다. 또한 값싼 중국산 농산물의 수입으로 인해 농민의 경농에 대한 열정이 그 어느 때보다 낮은 것이 사회적인 문제가 되고 있다. 이러한 상황에 처해있는 농민을 보호하고 외국 농산물로부터 국내 시장을 보호하는 길은 무공해 식품을 생산하여 소비자에게 공급하는 길 밖에 없다. 한편, 전세계적으로 새로운 유용 미생물 또는 유전자들이 특허에 의해 보호되고 있는 추세에 비추어 볼 때, 우리 나라에서 이들을 확보하지 못할 경우, 추후에 이들로부터 유래되는 형질전환 작물이나 생물제제들을 비싼 로열티를 지불하고 수입해야 하는 선진 농업국의 속국으로 전락할 위험에 처할 수도 있다. 이러한 관점에서 보면 본 연구는 농약과 비료의 사용을 줄일 수 있는 rhizobacteria로부터 유용유전자를 분리하여 rhizobacteria를 직접 사용했을 때의 문제점 (토양 정착력의 부재 등) 등을 극복하고 이의 응용성을 높여주는 데에 초점이 맞춰져 있기 때문에 우리가 직면한 현실을 극복하는데 크게 기여하게 될 것이다.

## 제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

### 1. 연구개발 목표와 내용

최종 목표 : Rhizobacteria의 식물병에 대한 유도전신저항성을 이용한 친환경 식물병 방제를 위하여

1. *P. chlororaphis* O6균주의 병저항성 유도 인자 및 발현조절기구를 규명하고
2. O6균주에 의해 유도되는 오이의 병저항성 유도 관련 유전자를 확보하고,
3. 이들 미생물 또는 식물 유래 병저항성 유도 유전자를 담배에 형질전환하여 병저항성 유도 능력을 검정하고,
4. 오이 뿌리 분비액 조성 및 이용능력 돌연변이주 분석에 의해 O6균주를 친환경 생물적 방제제로 제품화하고자 한다.

농업생산성을 높이기 위해 과다하게 사용되고 있는 비료나 농약 때문에 자연환경과 사람의 건강이 위협받고 있는 현 시점에서, 생산성을 유지하여 농가의 소득도 증대시키고 소비자들이 건강하게 살 권리도 충족시킬 수 있는 유일한 대안은 **환경 친화적인 농법의 개발**이다. 식물의 뿌리에 서식하는 rhizobacteria는 작물의 성장을 촉진시키는 기능뿐만 아니라, 작물에 전신적인 저항성 (systemic resistance)을 유도하여 각종 병원균에 의한 피해를 감소시킨다. 따라서 이러한 미생물들을 농업에 이용할 수 있다면 비료와 농약사용을 줄일 수 있어, 환경과도 조화로우며 사람의 건강에도 도움이 되는 농사를 지을 수 있을 것이다.

그러나 이들 rhizobacteria를 농업에 이용하는 것은 아직까지는 초보 단계이다. 그 근본적인 이유는 아마도 아무리 능력이 탁월한 rhizobacteria를 분리하여 확보하였다더라도 이들을 작물의 근권에 정착시킬 수가 없었기 때문일 것이다. 본 연구에서는 이들 rhizobacteria가 가지고 있는 유용한 기능을 농업에 이용하기 위하여 지금까지 수행되었던 연구와는 매우 다른 방법을 고안하였다. 즉 작물에 저항성을 유도하기 위해서 rhizobacteria는 저항성 유도인자를 생산하게 되는데 이 유도인자 유전자를 클로닝하여 담배에서 발현시켜 병 저항성이 유도되는지를 확인하려고 한다. 한편, 이들 결정인자에 의해 작물에서 유도발현되는 유전자들을 클로닝하여 작물에 형질전환 함으로써 병 저항성을 제고시켜 볼 것이다. 본 연구실에서 확보하고 있는 생물적 방제 rhizobacteria인 *Pseudomonas chlororaphis* O6 균주의 접종에 의해 유도 발현되는 오이 유전자들을 얻고자 하였다. 이를 위하여 O6균주를 오이 백성특호 품종의 종자에 코팅처리한 후 발아하여 3주가 지난 유묘의 지상부에 오이 같

반병균을 접종하였다. 갈반병균을 접종한 후 12 시간이 지난 처리구의 잎과 대조구 (O6균을 처리하지 않고 지상부에 갈반병균만을 접종하여 12시간이 지난 오이) 잎에서 추출한 각각의 mRNA를 이용하여 subtractive hybridization을 수행하였고, 이로부터 O6균의 처리에 의해 대조구보다 빠르게 증폭 발현되는 많은 유전자들을 클로닝하였으며 이들의 발현양상을 비교 분석한다. 이러한 유전자 pool에서 O6균주에 의해 가장 빠르고 강하게 증폭발현이 이루어졌던 *CsGolS2* 유전자를 담배에 형질전환하여 병 저항성을 제고하는 기능이 있는지의 여부를 확인한다. 한편, 각종 작물 뿌리분비액의 이용에 관련된 rhizobacteria의 유전자들을 클로닝하고 이들의 발현조절 양상을 확인함으로써 이를 미생물 실용화의 기초자료로 삼고자 한다.

#### 가. Rhizobacteria의 병 저항성 유도인자 클로닝 및 기능분석

Rhizobacteria인 *P. chlororaphis* O6의 병 저항성 유도인자 유전자를 Tn5 돌연변이 방법에 의해 클로닝하고 이 유전자 발현의 특성을 분석한다. 이 병 저항성 유도인자 유전자를 다른 고기능성 유용균이나 발현산물의 대량생산용 균에 형질전환하여 실용화, 상품화를 시도해 본다. 이 유도인자 유전자를 담배에서 발현시켜 병 저항성이 유도되는지의 여부를 확인한다.

#### 나. Rhizobacteria에 의해 유도되는 식물 유전자의 클로닝 및 기능분석

Rhizobacteria인 *P. chlororaphis* O6균주의 접종에 의해 유도되는 작물 유전자들과, rhizobacteria와 각종 병원균을 작물에 접종했을 때 유도되는 유전자들을 subtractive hybridization에 의해 클로닝하고 그 발현양상을 비교 분석한다. 이러한 유전자 pool에서 병 저항성의 유도가 가능한 유전자들을 담배에 형질전환하여 병 저항성을 제고하는 기능연구를 수행한다.

#### 다. Rhizobacteria의 식물뿌리 분비액 이용에 관련된 유전자의 탐색

오이 뿌리 분비액을 분리하여 탄소원의 조성을 비교하고, 이러한 분비물의 이용에 관여하는 rhizobacteria의 유전자들을 클로닝하여 발현조절 양상을 확인한다. 이들 결과는 식물 근권 정착능력과의 관계를 밝히고 O6 균을 제제화하는데 기초자료로 이용한다.

## 2. 연구개발 방법 및 설계

### 가. 공시작물

본 실험에서는 일본 수입종인 백성3호 오이를 사용하였다. 우선 오이 종자는 3% sodium hypochlorite로 10분간 표면 살균한 후 멸균수로 3번 씻어내어 멸균된 상토에 심었다. 상토는 blumenedre를 사용하였고 상토의 멸균은 60분간 2번 autoclave하여 멸균된 plastic pot에 담아 멸균된 종자를 심었다. 종자를 심은 plastic pot들은 27 °C 80% RH의 growth chamber에서 2엽기까지 키운 후 실험에 사용하였다.

### 나. 공시균주

본 실험실에서 사용하고 있는 rhizobacteria인 *Pseudomonas chlororaphis* O6를 공시 균주로 사용하였다. *P. chlororaphis* O6균주는 토마토의 성장을 촉진할 뿐만 아니라 Phenazine, HCN, protease등의 항균 물질을 생산하는 생물적 방제균으로서 본 실험실의 연구 재료로 사용되고 있는 균주이다. 오이에 사용된 병원균으로는 최근에 일본 수출용 오이재배 단지에서 크게 문제되고 있는 갈반병을 일으키는 병원균인 *Corynespora cassicola*를 본 실험실에서 분리하였고 이 병의 발생 생태에 관한 연구를 수행중이다.

### 다. Tn5돌연변이에 의한 병 저항성 능력 상실 균주 선발

오이에 병 저항성을 유도하는 *P. chlororaphis* O6균주를 Tn5 돌연변이 방법에 의해 병 저항성 유도 능력이 상실된 돌연변이주들을 선발하였다. 돌연변이 방법은 transposon내에 replicon을 가지고 있는 pRL1063a를 tri-parental mating에 의해 O6균주에 옮긴 후 transposon이 삽입된 rhizobacteria의 돌연변이주들을 kanamycin이 첨가된 배지에서 선발하였다. 1/2 MS 배지에서 키운 담배에 각각의 돌연변이주들을 접종하고 난 후 무름병, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*에 대해 병 저항성 능력이 상실된 돌연변이주를 선발하였다.

### 라. 병 저항성 유도 상실 돌연변이주의 Tn5 flanking sequence의 클로닝

병 저항성 유도 능력이 상실된 돌연변이주들에서 transposon이 삽입

된 flanking sequence를 알아보기 위해 각각의 돌연변이주들로부터 genomic DNA를 분리하여 이들을 transposon을 절단하지 않은 제한 효소로 절단하여 self-ligation시킨 후 *E. coli* DH5a에 형질전환하여 kanamycin 저항성 clone들을 선발하였다. 이를 증식시킨 후 plasmid를 순수 분리하여 sequencing하고 transposon이 들어간 부위의 flanking sequence를 알아냈다. 각 돌연변이주의 flanking sequence는 BLAST search에 의해 유전자의 특성을 밝혔다.

#### 마. *P. chlororaphis* O6균주의 genomic library조제

병 저항성 유도에 관련된 유전자를 cloning 하기 위해 위에서 선발한 flanking sequence를 가진 clone들을 digoxigenin으로 labeling한 후 이것을 probe로 하여 colony hybridization에 의해 full length clone들을 찾아냈다. 병 저항성 유도 균주의 genomic library 조제는 cosmid vector인 pCPP46를 이용하여 만들었다. 우선 O6의 genomic DNA를 분리한 다음 *Sau*3A1으로 partial digestion한 후 20-40 kb DNA fragment들을 순수 정제하여 CIAP를 처리하여 dephosphorylation시켰다. pCPP46 vector는 *Bam*HI으로 절단한 후 다시 CIAP를 처리하여 dephosphorylation하였다. 절단된 cosmid vector와 partial digest된 genomic DNA를 ligation한 후 Gigapack III gold packaging extract를 이용하여 packaging한다. packaging된 DNA는 *E.coli* XL-1 MR strain에 *in vitro* transduction에 의해 genomic library를 만들었다.

#### 바. 유도 저항성 결정 인자의 cloning

위에서 선발된 transposon이 삽입된 clone들을 digoxigenin으로 labeling 한 후 위에서 조제한 genomic library와 colony hybridization에 의해 원하는 유전자를 cloning하였다. Colony hybridization 방법은 본 실험실에서 사용했던 방법을 이용하여 실시하고 subcloning에 의해 원하는 유전자 단편을 찾았다. Cloning된 유전자 단편들은 sequencing에 의해 각각의 유전자의 특성을 밝혔다.

#### 사. Complementation

각각의 subcloning된 유전자 단편을 병저항성 유도 능력이 상실된 돌연변이주에 triparental mating에 의해 전이시켜 그들 유전자가 Tn5 돌연변이

주들의 병 저항성 유도의 직접적인 원인인지를 확인하였다. 최종적으로 돌연변이주의 식물 성장 촉진과 병 저항성 유도 형질이 회복되는 clone들을 선발하였다.

#### 아. 병 저항성 결정 유전자의 발현 분석

병 저항성 유도를 결정하는 유전자들의 발현조절 기작을 밝혀 이를 실용화하는데 기초자료로 이용하였다. O6균을 여러 가지 배지 조건에서 생육기별로 total RNA를 분리하여 병 저항성 결정 유전자를 probe로 하여 northern hybridization이나 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 함으로서 유전자들의 발현조절 양상을 확인하였다.

#### 자. 병 저항성 결정 유전자의 담배 형질전환

O6 균주에서 분리한 병 저항성 유도 유전자들을 우선 담배에 형질전환한 후 이들 유전자가 식물체내에서 발현이 되는지 등을 확인하였고 발현이 확인된 형질전환 식물체에서 병원균(무름병) 침입 시 저항성이 유도되는지를 검토하였다.

#### 차. 작물의 뿌리 분비액 조성 조사

오이 품종 백성 3호를 생육시켜 뿌리 분비액의 분리 방법은 본 연구팀에서 사용했던 방법을 이용하여 오이 뿌리 분비액을 분리하였다. 간략히 설명해 보면, 공시 작물들을 표면 살균하여 멸균된 토양에서 4-6 주간을 멸균된 growth chamber에서 생육시킨 다음, 뿌리를 멸균된 증류수에 여러 번 침지하여 용출한 뿌리 분비액들을 0.2  $\mu\text{m}$  syringe filter를 이용하여 멸균시킨 후 실험에 사용하였다. 식물 서식균들이 식물체에 정착하기 위해서는 식물 뿌리 분비액이 서식균의 주 탄소원이어야 한다. 따라서 오이 뿌리 분비액의 당과 유기산 조성이 같은지를 조사하였다. 뿌리 분비액의 당과 유기산의 조성은 Johnson 등의 방법을 이용해 HPLC columns을 통해 결정하였다. HPLC columns들은 유기산의 조성을 알아보기 위해서는 Rspak KC-81 (Shodex, Japan)을, 당의 조성을 알아보기 위해서는 Shodex Sugar SH1011 그리고 SH1821을 이용하여 양을 결정하였다.

카. 뿌리 분비액을 영양원으로 이용하는데 이상이 생긴 돌연변이주 선발

Transposon mutagenesis에 의해 선발된 돌연변이주들의 오이 토마토 뿌리 분비액의 영양분 이용도를 조사하였다. 분비액을 멸균된 ELISA plate에 200  $\mu$ l 넣고 난 후 각각의 돌연변이주와 wild type을 positive control로 접종하여 shaking incubator에서 배양하면서 균의 생육 정도를 조사하였다. 접종 후 시간대별로 균의 생육 정도를 ELISA reader를 이용하여 595nm에서 optical density를 측정함으로써 각각의 돌연변이주의 생육정도를 측정하였다. 돌연변이주들을 생육정도에 따라 구분하게 되는데 생육이 빨라지는 것, 생육이 늦어지는 것, 생육이 안되는 것 등등, 또한 같은 돌연변이주에서도 식물이 달라짐에 따라 생육이 변하는 것 등등 여러 가지 돌연변이주들을 구분하였다. 오이 뿌리 분비물 구성에 따라 rhizobacteria의 뿌리 정착에 어떠한 영향을 주는지도 밝힘으로서 rhizobacteria를 실제 포장에 사용할 때 중요한 정보를 제공하고자 하였다. 일반적으로 Pseudomonas속들의 세균들은 유기산을 호기 탄소원 (preferable carbon source)으로 사용하며 거의 대부분의 식물병원 진균들은 당을 주 탄소원으로 사용하는 것으로 알려져 있다. 그래서 실제 포장에서 rhizobacteria를 처리할 경우 유기산을 함께 살포함으로써 rhizobacteria의 정착에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다. 또한 본 연구 결과에 의하면 어떤 종류의 유기산들은 식물체에 살포하였을 때 식물에 저항성을 유도하는 유전자의 발현을 증가시켰다 (unpublished data).

타. 실용화 제제화

위의 실험 결과들은 식물의 뿌리에 정착하는데 rhizobacteria에게 어떤 물질들이 영양원으로 필요하며, rhizobacteria가 식물의 생장을 촉진하고 병 저항성을 유도하는데 어떤 영양원들이 요구되는지 등을 밝혔다. 이러한 결과를 기초로 해서 O6 균주를 오이의 뿌리에 접종할 때 이러한 물질들을 같이 주입함으로써 rhizobacteria의 식물 정착 능력을 향상시킬 뿐만 아니라 유용형질들의 발현을 향상시킬 수 있을 것이다. 이러한 실험은 마지막 해인 3년 차에 이들 물질을 균을 접종할 때뿐만 아니라 물을 관주할 때도 필요한 양만큼 관주하여 이들 영양분의 관주가 *P. fluorescens* 정착 능력과 병 저항성 유도 능력에 어떠한 효과가 있는지를 확인하고 궁극적으로는 이들 물질과 새로이 본 실험에 의해 조제된 rhizobacteria의 상품화를 시도하였다.



#### 과. 공시균주 및 병원균 접종방법

본 실험실에서 확보하고 있는 rhizobacteria인 *Pseudomonas chlororaphis* O6를 공시 균주로 사용하였다. *P. chlororaphis* O6균주는 작물의 생장을 촉진할 뿐만 아니라 phenazine, HCN, protease 등의 항균 물질을 생산하는 생물적 방제균으로서 본 실험실에서 수행중인 여러 가지 연구의 재료로 이용되고 있다. O6 균주를 King's medium B (KB) 고체배지에 접종하여 28℃에서 24시간 동안 배양한다. 배양 후 오렌지 빛깔을 띠는 O6균을 끓어모아 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0)에 현탁한 다음, 동량의 2% methylcellulose (Sigma)와 잘 섞어주었다. 종자 당  $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$  colony forming unit (cfu)의 농도로 공시 균을 코팅한 후 후드에서 자연 건조시켰다. 멸균한 상토에 균을 코팅한 오이 종자를 파종하여 일주일 후 2 개의 자엽이 형성되었을 때,  $1 \times 10^8$ 의 농도로 조정된 O6균주 현탁액을 20ml 씩 뿌리주위의 토양에 관주해 주었다. 병원균으로는 오이에 갈색의 잎반점 증상을 일으키는 갈반병균 (*Corynespora cassiicola*)을 사용하였다. *C. cassiicola*를 Czapek solution agar (CSA; Difco) 배지에 접종하여 28℃의 암 상태에서 2 주간 배양하였고 자라난 기중균사를 멸균된 부드러운 붓으로 제거한 후 후드에서 자연건조시켰다. 건조된 배지를 2,000 lux 정도의 빛이 내리쬐는 28℃의 항온기에서 일주일간 배양하여 포자를 형성하였다. 형성된 포자를 멸균수에  $5 \times 10^4$  spores/ml의 농도로 조정하여 오이 잎에 분무 접종하였다.

병 저항성 검정 실험재료로 *Arabidopsis thaliana*도 사용하였는데, *A. thaliana*에 병을 일으킬 수 있는 곰팡이인 *Botrytis cinerea* 4709를 28℃의 항온기내 PDA배지에서 계대 배양하였고, 분생포자 형성을 위해서는 균총을 1/2 PDA배지에 옮긴 후 균사가 충분히 배지를 덮었을 때 창가에 반나절에서 하루정도 놓아두었다. 현미경상에서 spore 형성을 확인한 후 이를 PDB에 현탁하여 *Arabidopsis* 잎에 3-5 $\mu$ l씩 drop 하였다. 접종 농도는  $2 \sim 4 \times 10^4$  spores/ml로 맞추었고 접종 후 7-10일 후에 병반을 확인하였다.

#### 하. 오이 잎 cDNA library 제작

표면살균을 한 오이종자에 O6현탁액을 코팅하고 파종하여 성장상 (26℃, 30000 Lux, 12 hr photo-period, RH 50-60%)에서 생육시켰다. 파종 후 일주일이나 지나 자엽이 전개되었을 때 뿌리주위의 토양에 O6 현탁액( $10^6$  cfu/ml)을 20ml씩 관주하여 2차 접종하였다. 4 - 5엽기까지 자란 오이 잎에

$10^6$  spores/ml 농도의 오이 갈반병균 포자현탁액을 식물체 전체에 분무 접종하여 28 °C의 dew chamber(RH100%)에서 12시간 동안 처리하였다. 처리 후 즉시 잎을 회수하여 liquid nitrogen을 이용, 마쇄하였고 Phenol/SDS/LiCl method에 의해 total RNA를 추출하였다. 갈반병균이 잘 접종되었는지의 여부와 발병정도는 접종 5일 후, 전체 잎에 형성된 병반수로 조사하였다. QIAGEN의 Oligotex mRNA batch protocol에 준하여 total RNA로부터 고 순도의 mRNA를 추출하였고, Stratagene의 cDNA synthesis Kit (#200400)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. Messenger RNA 5 $\mu$ g을 cDNA로 전환시킨 후, Sepharose CL-2B gel filtration medium을 넣은 drip column을 이용하여 size fractionation 하였다. 약 400 bp 이상의 cDNA들을 Uni-ZAP XR vector에 ligation하고 Gigapack III Gold Kit로 packaging하여 cDNA library를 조제하였다.

#### 거. Subtractive hybridization

Clontech의 PCR-select cDNA Subtraction Kit를 이용하여 각각 Tester mRNA (O6균을 접종한 후 오이갈반병균 접종)와 Driver mRNA (O6균을 접종하지 않고 오이 갈반병균만 접종) 2 $\mu$ g씩에 상응하는 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 각각 *Rsa* I으로 소화하여 확인한 다음 각각의 digest에 adapter1과 adapter2R을 접지하여, Tester의 경우 과량의 Driver DNA (forward subtraction)와 함께, Driver의 경우 과량의 Tester DNA (reverse subtraction)와 함께 각각 first 및 second hybridization을 수행함으로써 O6균에 의해 강하고 빠르게 유도되는 cDNA와 반대로 대조구에서 유도발현되는 cDNA들을 각각 enrich시켰다. 이렇게 해서 얻은 forward-subtracted experimental cDNA와 unsubtracted tester control, reverse-subtracted experimental cDNA 및 PCR control subtracted cDNA들을 PCR primer 1을 이용하여 증폭하였고 그 다음 nested PCR primer 1과 2R을 이용하여 증폭시킴으로서 위에서 조제한 오이 cDNA library를 screening 할 수 있는 probe DNA들을 얻었다.

#### 너. Differential screening

Differential screening은 PCR-Select Differential Screening Kit를 이용하여 수행하였다. subtractive hybridization에 의해 얻은 O6균에 의해 강하고 빠르게 유도되는 cDNA가 많은 cDNA probe와 반대로 대조구에서 유도 발

현되는 cDNA가 많은 control cDNA probe를 각각 조제하였고, 150 mm NYZ agar에 오이 잎 cDNA library를 plating하여 얻은 duplicated nylon membrane을 differential screening하였다.

#### 더. Northern blot analysis

O6균을 접종한 오이 잎과 O6균을 접종하지 않은 오이 잎에 각각 *C. cassiicola* (challenger)를 처리하였고, 0, 12, 24, 36, 48, 72시간이 지난 오이 잎으로부터 total RNA를 추출하여 1.2% formaldehyde/ agarose gel에 전기영동한 다음 nylon membrane에 blotting하였다. 각 유전자의 specific expression pattern을 보기 위해 3'untranslated region에서 primer를 제작하여 PCR로 증폭한 다음 P<sup>32</sup>로 labeling한 probe를 이용하였다.

#### 러. Real time RT-PCR

획득한 유전자들의 유도발현 정도를 양적으로도 살펴보기 위하여 Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)을 수행하였다. O6를 접종한 오이의 잎과 O6를 접종하지 않은 오이의 잎에서 *C. cassiicola* (challenger)를 처리하여 시간대 별로 추출한 total RNA들을 QuantiTect SYBR Green reverse transcription PCR kit(cat. no.204243;Qiagen)에 첨가, Rotor-Gene 2000 Real-Time Cyclor machine(Corbett Research, Australia)를 이용하여 측정하였다. 각 유전자의 specific한 primer를 제작하여 최종 볼륨이 25ul가 되도록 kit의 enzyme과 잘 섞은 후, initial denaturation과정은 94 °C에서 2분, denaturation과정은 94 °C에서 30초, annealing과정은 55 °C에서 30초, extention과정은 72 °C에서 45초씩 45cycle을 수행하였다. 제작하여 사용한 primer는 다음과 같다:

$\beta$ -actin gene forward, 5'-GGCCGTTCTGTCCCTCTAC-3';  
reverse, 5'-CAGCTCCGATGGTGATGAC-3',  
peroxidase gene forward, 5'-CTGACATTCTACTAGCCCTTGGTTCT-3';  
reverse, 5'-TCTGCGTTTGGATTATTGTTTAGG-3',  
*PRI-1a* gene forward, 5'-GGCAGCCCAGACTTCTCAGC-3';  
reverse, 5'-GCATCTCACTTTGGCACATCCTA-3',  
*PAL1* gene forward, 5'-ATAACGGTTTGCCTTCTAATCTT-3';

reverse, 5'-CATCCTGGTTGTGTTGCTCA-3'),  
*CsGolS2* gene forward, 5'-CAGCAAACCAGACCCAATTT-3';  
reverse, 5'-TCCACTTGGCATTTC AAACA).

#### 머. Abiotic stress 처리

*CsGolS2* 유전자의 drought, cold, dark와 같은 abiotic stress 에 대한 발현양상을 알아보기 위해 멸균된 상토에 4주간 오이를 키웠다. 가뭄조건은 매일 관주하여 물을 준 대조구와 달리 일주일간 계속 물을 주지 않음으로서 처리하였고, 저온조건은 암상태의 8 °C의 incubator에 3 시간 동안 방치함으로서 처리 (대조구도 동일하게 상온에서 암 처리하였음) 하였으며, 암 조건은 생육 온도에 맞춰진 암상태의 incubator안에 3 시간 동안 처리하여 유전자 발현여부를 확인하였다.

#### 버. *CsGolS2* 유전자의 담배 형질전환

Subtractive hybridization에 의해 획득한 *CsGolS2* 유전자를 담배에 형질전환하기 위하여 pBI121 binary vector (그림 2.1A)를 선택하였다. Full-length *CsGolS2* 유전자를 pBI121 벡터에 삽입하기 위하여 synthetic nucleotide를 제작하여 벡터 후미 multiple cloning site에 *SalI*, *KpnI*, *BamHI* enzyme site를 새로이 창출하였고 이를 pBI121-1으로 명명하였다 (그림 2.1B). *CsGolS2* 유전자를 cloning하기 위해 pBI121-1 벡터는 *XbaI*과 *KpnI* enzyme으로 digestion하여 GUS을 삭제한 다음 *CsGolS2*의 *XbaI*과 *KpnI* site를 각각 첨가한 start codon과 stop codon을 벡터에 접지시킨 후(그림 2.1C) *E. coli* cell(DH5a)에 transformation 하여 cloning 여부를 확인하고 *Agrobacterium* LBA4404에 다시 형질전환 하였다.

담배 형질전환을 위하여 MS배지에 wild type인 Xanthi의 종자를 표면 살균하여 파종한 후 4-8주간 잎이 5엽 정도 자랄 때까지 키웠다. Binary 벡터가 들어가 있는 *Agrobacterium* LBA4404는 형질전환 하루 전에 배양하여 OD 값을 0.6-0.8로 맞춰 MS 배지에 현탁하였다. 멸균된 petri dish에 *Agrobacterium*을 붓고 clean bench에서 적당한 크기로 자른 담배 잎을 넣어 5-10 분간 방치하였다. 멸균된 3MM paper에 *Agrobacterium*에 젖은 담배 잎을 올려놓고 물기를 말린 후에, MS에 NAA와 BAP이 첨가된 배지로 치상하여 암상태의 25°C incubator에 2일간 두었다. 이틀 후에 담배 잎을 shooting

induction 배지에 옮겨 callus와 shoot가 나올 때까지 배양하였고 2주 간격으로 계대배양 하였다. Callus에서 조그만 shoot가 나오면 새 배지에 계대하여 충분히 키운 다음, shoot별로 구분하여 잘라 root induction 배지로 옮겼다. Root induction이 확인되면 이를 멸균된 상토에 옮겨 심어주고, 비닐봉지로 100% 습한 상태를 유지하여 활착시킴으로서 형질전환 된 담배를 얻었다.

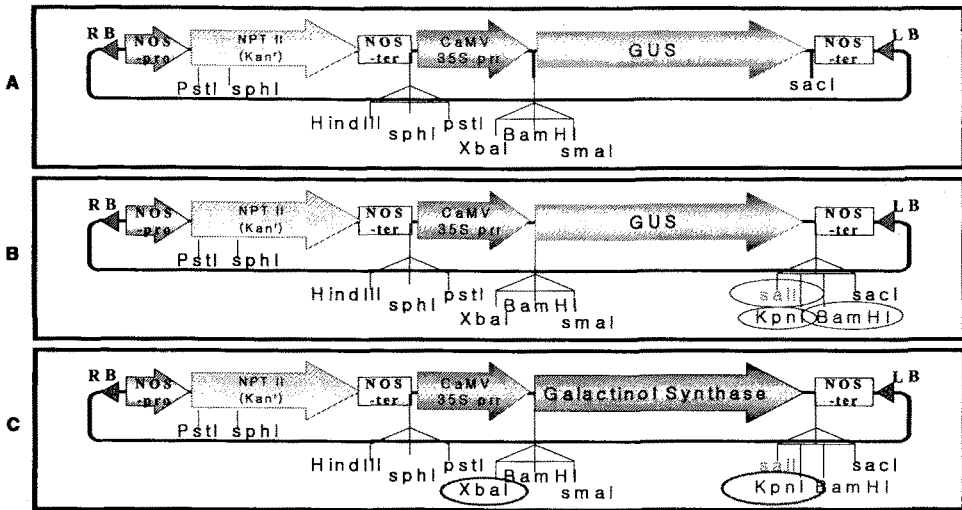


그림 2.1. 담배 형질전환을 위한 binary vector construction

서. *CsGolS2* 유전자의 벼 형질전환

오이에서 분리된 *CsGolS2* 유전자를 *Bgl*II site가 있는 forward primer와 *BstE*II site가 있는 reverse primer를 이용하여 PCR생성물을 얻고 이를 동일한 효소(*Bgl*II, *BstE*II)들로 절단하여 1.1kb의 *CsGolS2*를 준비하였다. 이와 같이 준비된 *CsGolS2* 유전자 단편과 동일한 효소들로 절개된 pCambia1201를 ligation하여 pCambia1201:*CsGolS2* cassette를 제조하였다.

동진벼(*Oryza sativa*)의 callus가 *Agrobacterium*을 이용한 벼 형질전환에 이용되었다. 먼저 우량 종자 만을 선별하여 깨지지 않도록 유의하여 종피를 벗겨낸 다음, 70% 에탄올 10mL에 약 30초 동안 표면 살균 후 3차 증류수로 잘 행구어 준 다음 약 50분 동안 10mL의 2% NaOCl에 50분간 침지시켜 살균하였다. 이후 멸균된 증류수 30mL로 약 3-4번 반복해서 세척하였다. 이 종자

는 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)가 2mg/L 함유된 켈루스 유도 배지, 2N6 basal (2N6 basal-N6 salts and vitamin, 5mg/L Fe<sub>2</sub>EDTA, 300mg/L casein enzymatic hydrolysate, 500mg/L proline, 500mg/L glutamin, 30g/L sucrose, 2mg/L 2,4-D, 4g/L phytigel, pH5.8)에 치상하여 암 상태에서 배양하였다. 배양 후 3-4주가 지나면 벼 종자의 배반으로부터 켈루스가 유도되었고 이렇게 배반으로부터 유도된 켈루스를 활성화하여 균주와 공조 배양시키기 위해, 지름이 1-2mm 인 둥근 모양의 윤기 있는 켈루스만을 선별하여 같은 배지에서 계대 배양하면서 3-4일 동안 암 상태에서 켈루스를 활성화시켰다.

pCAMBIA1201를 가지고 있는 *A. tumerfaciens* LBA4404 균주를 5 $\mu$ g/mL kanamycine 과 20 $\mu$ g/mL hygromycin 이 함유된 YEP 배지에서 하루 동안 배양하여 농도가 OD600에서 2.0정도의 탁도로 준비하였다. 균주가 준비되면 3000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 침전된 pellet을 acetosyringone이 함유된 5ml의 AA-AS (AA macroelement, N6 micro element & vitamin, 5mg/L Fe<sub>2</sub>EDTA, 1mg/L 2,4-D, 20g/L sucrose, pH5.8 and containing 100 $\mu$ M acetosyringone) 배지에 녹였다. 멸균된 petri-dish에 *Agrobacterium*이 포함된 위의 AA-AS 배지를 준비하여 켈루스를 넣고 약 30분간 공조배양 시켰다. 공조배양이 끝나면 멸균된 여과지 위로 옮겨서 물기를 제거한 후 1mL의 AA-AS배지로 포화시킨 멸균된 여과지가 깔려있는 2N6-AS(2N6-basal (except sucrose) with 10g/L glucose and add acetosyringone (100 $\mu$ M) after autoclaving, 4g/L phytigel, pH5.2) 배지로 공조 배양한 켈루스를 옮겨 암 상태의 28 $^{\circ}$ C의 incubator내에서 2-3일간 배양하였다.

2-3일간 공조배양을 시키면 켈루스 표면에 *Agrobacterium*이 과도하게 자라는 것을 제거하기 위해 30mL의 cefotaxime water (250mg/L)가 담겨있는 삼각플라스크에 켈루스를 옮겨서 3-4회 걸쳐 흔들어 주면서 켈루스 표면을 씻어주었다. 이 켈루스를 멸균된 여과지 위로 옮겨 물기를 제거하고 선발배지인 2N6-CH (2N6-basal medium with 40mg/L hygromycin and 250mg/L cefotaxime, 4g/L phytigel, pH 5.2)배지로 옮겨 암상태에서 배양하였다. 2주에 2회 정도 새로운 2N6-CH배지로 옮기면서 살아남은 형질이 전환된 켈루스를 선별하여 재분화 배지인 MS-BN (MS salts & vitamins, 2g/L casmino acid, 20g/L sorbitol, 30g/L sucrose, 2mg/L BAP, 1mg/L NAA, 40mg/L hygromycine, 250mg/L cefotaxime, 4g/L phytigel, pH5.8) 배지로 옮겨 재분화 시켰다. 약 2주에 한번 씩 새 배지로 옮겨주어 배양 후 약 한달 이 지나면 엽록소가 생성되며 초엽이 다중 분화되었다. 잎이 전개되고 뿌리의 발생이 보이면 그 개체만을 떼어내어 MS-RT (MS salts & vitamins, 2g/L casmino

acid, 20g/L sorbitol, 30g/L sucrose, 4g/L phytigel, pH5.8)배지로 옮겨 뿌리를 유도시켰다. 약 1주일이 지나 뿌리가 왕성하게 유도되면 각 개체를 원예용 상토와 vermiculite를 1:1로 혼합한 토양을 담은 포트에 이식하여 1주일 정도 순화시킨 후 포장에 이식하였다.

나. 연구개발 추진 체계

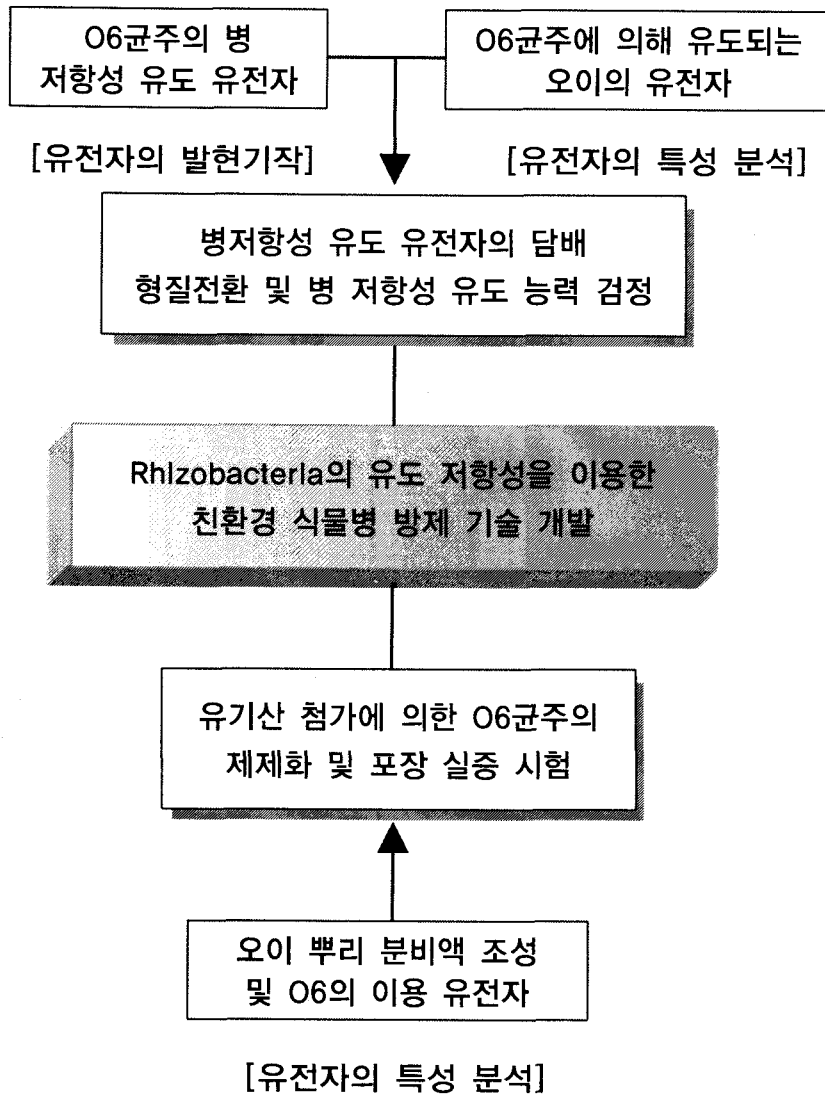


그림 2.2. 연구개발 추진 체계



# 여 백

## 제2장 국내외 기술 개발 현황

여 백

## 제 1 절 국외 관련 기술의 현황

현재 rhizobacteria에 의해 유도되는 식물병 저항성 유도 기작에 관한 연구는 국제적으로도 시작단계이지만, 이들 균주를 상업적으로 이용하고자 하는 시도는 많이 있어왔고, 제품화되는 숫자가 증가되고 있다. 이들 균주를 제형화하는 방법들도 한 개의 균주를 이용하는 방법보다는 여러 개의 미생물을 혼합하는 방법들이 주로 이용되고 있고, chitosan등을 첨가하여 그 기능을 증가시키는 방법도 진행 중이다. 이들 rhizobacteria의 병 저항성 유도 능력을 지닌 인자를 찾는 연구나 이들 rhizobacteria에 의해 유도되는 식물의 유전자에 대한 연구는 전무한 상태이다. 따라서 본 연구와 관련된 실용적 이용 가능성에 대한 최근의 연구 결과들의 현황을 살펴보면 다음과 같다.

식물 뿌리에 서식하는 *Pseudomonas*나 *Serratia*속 등의 몇 가지 식물 근권 세균(rhizobacteria)들을 이용하여 식물병을 방제하는 연구가 활발히 진행되어 여러 가지 rhizobacteria가 상품화되어 가고 있고 그 효능도 실제 포장에서 확인되었다 (Kloepper et al. 1980; Kloepper et al. 1992; van Loon et al. 1998; Wei et al. 1996). 이러한 식물근권 세균들은 주로 뿌리 주위에서 서식하지만 그들이 존재하지 않는 곳에 발생하는 병의 감소까지 가져오는 전신적 병 저항성을 유도하는 능력이 있다 (Glick and Bashan 1997; O'Sullivan and O'Gara 1991). 지금까지 연구된 바에 의하면 이러한 rhizobacteria의 접종에 의해, 작물에서 발생하는 곰팡이병, 세균병, 바이러스병 뿐만 아니라 곤충 및 선충에 의한 피해도 줄일 수 있었다 (Rmamootty et al. 2000; van Loon et al. 1998; Wei et al. 1996). Rhizobacteria에 의해 유도되는 병 저항성은 broad spectrum을 가지고 있어서 한가지 rhizobacterium의 식물체 정착이 여러 종류의 병원균에 의한 피해로부터 식물을 보호하는 경우가 일반적이다. 그 대표적인 예로 토양에서 분리된 rhizobacteria의 하나인 *Pseudomonas fluorescens* 89B-27을 오이 종자에 처리하였을 때 오이에 발생하는 탄저병, 세균성 점무늬병, CMV 바이러스병 뿐만 아니라 해충 피해 방제에 효과적이었다는 보고가 있다 (Rmamootty et al. 2000; van Loon et al. 1998; Wei et al. 1996). 지금까지의 연구 결과들을 종합해 보면 rhizobacteria에 의해 유도되는 병 저항성에 의해 쌍자엽 식물인 *Arabidopsis*, 강낭콩, 오이, 무, 담배, 토마토뿐만 아니라 단자엽 식물인 벼, 옥수수, sugarcane 식물에서 여러 가지 병원균에 의한 피해가 줄었으며 곤충이나 선충에 의한 피해도 감소하였다.

이러한 rhizobacteria에 의해 유도되는 병 저항성 기작에 관한 연구는 아주 미흡한 실정이다. Rhizobacteria를 처리한 강낭콩에서는 식물의 세포벽이 lignin화되었고 토마토에서는 *Fusarium wilt*를 일으키는 병원균이 침입

하는 부위의 식물 세포벽이 두꺼워졌다 (Hammerschmidt and Kur 1982; Ryu et al. 2000; Zodr and Anderson 1992). 그러나 일반적으로 다른 rhizobacteria의 접종에 의해서는 이러한 물질들의 집적이 일어나지 않아 pathogenesis-related proteins이나 phenolic compounds이외의 다른 화합물이 rhizobacteria에 의한 유도 저항성에 관련되어 있을 것이라는 견해가 지배적이다 (Hoffland et al. 1995; Pieterse et al. 1996; van Loon et al. 1998). Rhizobacteria에 의해 유도되는 병 저항성은 병원균에 의해 유도되는 저항성과는 달리 PR 단백질들의 발현이 유도되지 않고 SA를 분해하는 효소를 가진 형질 전환 식물체(*nahG*)에서도 wild-type과 같은 수준의 저항성을 유도하는 것으로 보아 병원균에 의해 유도되는 병 저항성과는 다른 경로를 통해 병 저항성이 유도될 것으로 추정되고 있으나 (Pieterse et al. 1996; van Loon et al. 1998) 아직 정확한 작용기작이나 경로는 물론 어떤 유전자들이 유도되는지에 대한 연구도 전무한 실정이다.

병 저항성을 유도하는 rhizobacteria의 전신저항성의 유도요인에 대한 연구는 주로 돌연변이주의 선발에 의해 수행되었는데 지금까지 rhizobacteria가 가지고 있는 병 저항성 유도인자들은 세균이 생산하는 lipopolysaccharide (LPS), exopolysaccharide(EPS), siderophore, salicylic acid (SA)등으로 알려졌다 (de Weger et al. 1987; Neilands et al. 1986; Park et al. 2000; Rmamootty et al. 2000; van Loon et al. 1998). 최근에 Bacillus가 생산하는 volatile compound인 butanediol이 식물의 성장을 촉진하고 병 저항성을 유도하는 능력을 가진 인자라고 추정되는 논문이 발표되었으나 (Ryu et al., 2003, 2004), 아직까지 이에 관한 연구는 초보단계로 어떤 병 저항성 결정인자들이 어떤 작용 기작에 의해 병 저항성을 유도하는지에 관한 구체적인 실험이 수행된 것이 없고, 이들 유전자를 클로닝하는 시도조차 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 rhizobacteria의 유도 저항성에 관련된 유전자들을 식물 병 방제에 응용하는 최초의 시도이다.

미생물의 식물뿌리 정착능력은 많은 식물-미생물 상호 작용에서 아주 중요한 factor로, rhizobacteria를 실제로 포장에서 사용하고자 하였을 때 가장 문제가 되는 점 중의 하나이다 (Glick and Bashan 1997). Rhizobacteria를 포장에 사용하고 그들의 능력을 증가시키기 위해서 식물뿌리 정착에 관련된 연구나 이에 관련된 세균의 유용 유전자의 발현 및 특성을 밝히는 연구가 절실히 필요하다. 지금까지 연구된 바에 의하면 일반적으로  $10^5$  colony forming unit/g of root 농도 이상의 rhizobacteria가 뿌리에 존재하였을 때 식물 병 저항성이 유도되고 그 이하인 경우는 저항성이 유도되지 않아 병 저항성을 유도하는 rhizobacteria의 식물정착 능력이 아주 중요한 요인중의 하나로 작용하였다 (Liu et al. 1995; Rmamootty et al. 2000; van Loon et al. 1998).

Rhizobacteria의 식물뿌리 정착 관련 연구는 주로 돌연변이주를 이용하여 수행되었는데, 지금까지 밝혀진 식물뿌리 정착에 관련된 유전자들은 세균의 운동성에 관련된 유전자 (motility, flagella, pili), lipopolysaccharide 생합성 유전자, 유기산을 이용하는 유전자 (malate dehydrase), 아미노산을 이용하는 유전자 등이 보고되었다. 또한 최근에 식물 뿌리 정착에 아주 중요한 역할을 하는 조절유전자인 *colRS* 유전자 site-specific recombinase가 밝혀졌고 실제로 이 유전자를 다른 종류의 뿌리정착 균에 옮겨 식물 뿌리 정착 능력을 증가시킨 예도 있다 (Bloemberg et al. 2000; Dekkers et al. 1998; Dekkers et al. 2000).

다른 식물종이나 품종에 따라 뿌리에 서식하는 유용미생물에 반응하고 미생물의 생육을 support하는 능력이 다르며 식물 종에 따라 rhizobacteria의 유전자 발현도 달라진다. 생물적 방제균인 *P. fluorescens*의 항균 물질인 pyoluteorin 생합성 유전자 발현도 접종한 식물 종에 따라 달라졌다 (Bull et al, 1991; Gamliel and Katan 1992). 이와 같은 결과로 볼 때 다른 식물 종이나 품종에 따라 뿌리 분비물의 조성이 달라 특정 미생물의 생육을 support하고 그 구성에 따라 유용 유전자의 발현이 달라진 것으로 추정된다. 식물체가 분비하는 영양분의 조성이나 그 영양분을 식물체표 서식균이 이용하는 방법에 대한 연구는 미미한 형편이다. 최근에 발표된 논문에 의하면 식물체표 서식 세균 *P. putida*는 식물체에서 분비되는 proline을 이용하는 유전자의 기능이 식물체 정착에 아주 중요한 역할을 할 것으로 추정되었다 (Vilchez et al. 2000). 또한 생물적 방제균인 *P. fluorescens*는 아미노산 생합성 유전자들이 토마토뿌리에 성공적인 정착을 위해 필요한 유전자라고 보고되었다 (Simons et al. 1997). 그리고 식물뿌리 분비액을 생장 배지에 첨가하였을 경우에는 fluorescent *Pseudomonas*속 균들의 생장이 진균의 생장보다 빠르다는 연구결과도 보고되어 있다 (Bloemberg et al. 2000). 그러나 고기능 rhizobacteria의 식물 정착 특히 뿌리 분비액의 이용에 관련된 연구는 전무한 상태이고 이들 뿌리 분비액에 존재하는 물질중에 rhizobacteria의 병 저항성 유도 인자의 발현이나 식물 정착에 필수적인 영양분의 규명 등에 관한 연구는 이들 rhizobacteria를 실제 포장에 실용화하는데 필수적인 연구 분야인데도 전무한 상태이다. 따라서 본 연구에 의해 이러한 물질들이 밝혀지면 이들을 실제 rhizobacteria를 실용화하는데 중요한 정보를 제공할 것으로 추정된다.

## 제 2 절 국내 관련 기술의 현황

### 1. Rhizobacteria에 의한 유도전신저항성에 관한 국내 연구 현황

국내에서도 *Burkeholderia cepacia*로부터 분리한 *exopolysaccharide*가 병 저항성 유도와 식물 성장을 촉진하는 *determinant*라고 농촌진흥청 식물 병리학 연구실 박경석 박사팀이 최근에 보고하였다 (Park et al. 2000a). 또한 이 연구팀은 rhizobacteria가 식물체에 PR protein과 peroxidase의 활성을 증가시켜 병 저항성을 유도할 것이라고 추정하였다 (Park et al. 2000b).

### 2. 앞으로의 전망

위에서 언급하였다시피 생물적 방제균을 실제 포장에서 사용하였을 경우 가장 문제시되는 단점은 생물적 방제균이 식물체에 지속적으로 정착하지 못한다는 것이고, 또 다른 하나의 문제점은 생물적 방제균이 식물체에 정착하였다 하더라도 새로운 환경에서 그 길항능력을 발휘하지 못하면 생물적 방제균의 실용화는 의미가 없다는 것이다. 본 연구는 농약과 비료의 사용을 줄일 수 있는 rhizobacteria로부터 유용유전자를 분리하여 이를 직접 작물에 형질전환 함으로써 rhizobacteria를 직접 사용했을 때의 문제점을 극복하고 이의 응용성을 높여주는 데에 초점이 맞춰져 있기 때문에 우리가 직면한 현실을 극복하는데 기여하게 될 것이다. 본 연구에 의해 rhizobacteria로부터 유래한 유도 저항성 유전자와 rhizobacteria에 의해 유도 발현되는 식물 유전자들을 식물체에 도입하여 병 저항성 형질전환 작물의 창출에 이용될 수 있는 가능성이 확인되면 이의 응용성은 궁극적으로 농업의 생산성 향상 및 농민의 소득증대로 이어질 것이다. 또한 rhizobacteria에 의해 유도되는 식물의 병 저항성 관련 유전자가 클로닝되어 저항성이 유도되는 기작이 밝혀지게 되는데 이 결과는 지금까지 세계적으로 연구된 경우가 없기 때문에 학문적으로 중요한 의미가 있을 뿐 아니라 새로운 가설을 세우는데 아주 중요한 정보를 제공할 것이다. 또한 본 연구는 연구 보조원들에게 새로운 가설을 세우고 증명해 보일 수 있는, 다시 말하면 그저 유전 공학적인 기법이나 실험기법을 배우는 연구원이 아닌 새로운 아이디어나 가설을 발전시켜 나가고 키워갈 수 있는 연구원들이 배출될 수 있는 기반이 될 것이다. 궁극적으로 붕괴 위기에 처해 있는 우리 나라 농업의 활로는 본 연구가 지향하고 있는 환경친화적인 방법에 의한 식물 병 방제에 의해, 농민들에게는 고소득의 기회를 소비자들에

개는 농약을 사용하지 않은 작물을 섭취함으로써 건강한 삶을 영위할 수 있는 기회를 제공할 것이다.

#### 가. 개발된 상품의 이용

본 연구에서 개발된 오팜-가드는 앞으로 여러 작물과 병해를 대해 병 저항성 예방 능력과 병저항성 억제 능력을 검정하여 더 많은 작물에 응용하려는 시도를 하고 있고, 다른 종류의 미생물 (식물생장 촉진)과의 혼용 등을 통해 그 적용 범위를 확장하려고 시도하고 있다. 또한 본 연구에서 분리된 O6 균주의 병 저항성 유도 능력에 관련된 유전자와 발현조절 기구에 대한 연구를 더 진행하여 병 저항성을 유도하는 물질을 동정하고, 이들의 물질을 최대로 발현시킬 조절 기구를 밝히는 중요한 재료로 이용될 것이다. O6균주에 의해 유도된 오이의 유전자들 또한 새로운 개념의 식물병 저항성 유도 유전자로서 가능성이 있을 것으로 사료되고 담배 뿐만 아니라 벼와 같은 작물에 형질 전환하여 병 저항성 유도 능력이 상승되는 지 등에 대한 확장 연구를 수행할 계획이다.



# 여 백

### 제3장 연구개발수행 내용 및 결과

여 백

# 제 1 절 토양서식균 *Pseudomonas chlororaphis* O6의 식물 병원균 억제 능력 및 식물병 전신저항성 유도능력

## 1. 서언

일부 근권 미생물은 식물 뿌리로부터 분비되는 영양분을 섭취하면서 증식하고, 직·간접적으로 식물에 영향을 주어 식물의 생육을 촉진시키거나 여러 유용형질을 발휘하여 식물병을 방제한다. 일부 생물적 방제균들은 직접적으로 호르몬을 생산하여 식물의 생육을 촉진시키거나 식물 병원균의 생장을 억제하는 항균 물질을 생산하여 식물을 보호한다.

발병 억제 토양 (suppressive soil)은 식물 병원 곰팡이와 세균에 의해 발생하는 식물병을 방제할 수 있는 능력이 있는 생물적 방제균을 지닌 토양이다. 이러한 생물적 방제 능력에 관련된 기작은 영양분에 대한 경쟁, 서식처 경쟁, 전신유도저항성 (induced systemic resistance), 항균 대사 물질의 생산이 포함된다. *Pseudomonas* 생물적 방제균은 phenazines, pyrrolitricin, 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) 및 pyoluteorin 등의 항균물질을 생산한다. 그러나 새로운 항균 대사 산물들 즉 cyclic lipopeptides, viscosinamide와 tensin도 보고되었다. 생합성 유전자의 상동성을 이용한 클로닝과 돌연변이주 조제를 이용한 연구에 기초하여 동정된 많은 생합성 유전자들의 기능이 밝혀지고 있으며, *Streptomyces*와 *Bacillus* 종들이 생산하는 항균물질의 생합성 유전자들도 알려져 있다.

여러 비병원성 *Pseudomonas* 속의 근권 세균들이 곰팡이, 세균, 바이러스를 포함한 여러 식물 병원균으로부터 식물이 보호될 수 있도록 전신 획득 저항성을 유도하는 능력을 지니고 발견되었다. 유도 전신저항성 (induced systemic resistance)은 전신획득저항성 (systemic acquired resistance)에 의해 조절되는 것과는 다른 신호 전달 조절에 의해 유도되고, ISR pathway는 식물체에 식물 병원균이 접종되었을 때 유도되며, 이러한 ISR을 유도하는 생물적 방제균들의 종류도 점점 많아지고 있다. ISR과 관련된 세균의 결정인자는 siderophore, lipopolysaccharide의 O-antigen, salicylic acid 등이 관련되어 있다고 추정된다.

먼저, 본 절에서는 연구실에서 분리한 *Pseudomonas chlororaphis* O6 균주의 식물병 방제 능력을 확인하기 위해 상기 균주가 식물병원균의 생육을 억제하는 이차 대사산물을 생산하는지를 확인하였고, 오이와 담배를 이용하여 전신획득저항성 유도 능력 (ISR)이 있는 지등을 확인하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 공시균주 및 배양

본 실험에서 사용한 각 균주의 특징은 Table 1.에 기술하였다. 모든 균주는 30 °C에서 LB 배지 (Bacto-trypton 10g, Bacto-yeast extract 5g, NaCl 10g, distilled water 1L, pH 7.5)에 배양시켰고, 생물 방제균인 *Pseudomonas* 균주들은 필요에 따라 King's medium B(Protease peptone No.3 20g, Agar 15g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.5g, Glycerol 10ml, distilled water 1L, pH 7.2±0.2 25°C) 배지를 사용하였다. 선별 과정에서 배지에 첨가하는 항생물질은 Tetracycline(12.5µg/ml), Ampicillin(50µg/ml), Kanamycin(100µg/ml)을 사용하였다 (Sambrook and Russell, 2001). 본 실험에 사용한 모든 균주는 -80°C에 보관하여 사용하였다.

Table 1.Characteristics of the bacterial strains and plasmids used in this work.

Strains or Plasmids	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Source or reference
<i>P. chlororaphis</i> O6	Wild-type, Phz <sup>+</sup> , Pro <sup>+</sup> , HCN <sup>-</sup> , Sider <sup>-</sup> , St <sup>r</sup>	This study
<i>P. fluorescens</i>		
2-79	Biocontrol bacterium, Phz <sup>+</sup> , HCN <sup>-</sup> , Rif <sup>r</sup>	Weller(1983)
Pf-5	Biocontrol bacterium, HCN <sup>-</sup> ,	Howell(1979)
<i>P. aureofaciens</i> 30-84	Biocontrol bacterium, Phz <sup>+</sup> , HCN <sup>-</sup>	PiersonIII(1992)
<i>Chromobacter violacearum</i>		
CV026	Mini-Tn5 mutant, HSL <sup>+</sup> Km <sup>r</sup>	McClean(1997)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Plant fungal pathogen	

<sup>a</sup>Abbreviations: Phz, phenazine; Pro, protease; HCN, hydrogen cyanide; Sider, siderophore; HSL, homoserin lacton; Km<sup>r</sup>, kanamycin resistance; Rif<sup>r</sup>, rifampicin resistance; St<sup>r</sup>, streptomycin resistance

### 나. 종자의 균피막화(encapsulation과 enumeration)

생물적 방제와 phytotoxicity 시험을 하기 위하여 보리 종자(*Hordeum vulgare* L.)를 사용하였다. 각 실험에서 약 100개의 건전 보리 종자를 선별하

여 5% (v/v)의 sodium hypochlorite (NaOCl)에서 5분 동안 표면살균을 처리 후에 멸균수에서 세척 후에 다시 살균된 흡습지로 수분을 흡수시켜 수분을 제거하였다. 멸균된 15ml conical plastic tube(Sewon Plastic Labware, Korea)에서 24시간 동안 키운 각 세균들을 현탁시켰다. 각 현탁액에 1%(w/v) methyl cellulose(Sigma Chemicals, USA)를 종자에 박테리아를 고착시키기 위해서 넣었다. 대조구로 보리종자에 1%(w/v) methyl cellulose와 함께 멸균된 증류수를 넣었다. 이 종자들을 상온에서 30분간 정치한 후 멸균된 petri dish에 종자들을 놓고 건조시켰다.

종자에 고착된 세균의 농도 측정은 10개 종자를 선택한 후 멸균된 15 ml conical plastic tube에서 10ml의 멸균된 증류수로 현탁하였다. 그리고 나서 이 tube를 vortex한 후 여러 농도로 희석하여 LB 배지에 100  $\mu$ l씩 분말하였다. 상온에서 48시간 배양한 후 단세포의 수를 측정하였다.

#### 다. 종자 발아

멸균된 Whatman #6 여과지가 있는 멸균된 petri dish에 10 ml의 멸균수를 넣었다. 그리고 각 strain들을  $10^{14}$  cfu/ml로 처리한 보리 종자와 물을 처리한 (대조구) 보리 종자를 약 1cm 간격으로 plate상에 놓았다. 그리고 빛이 없는 26 °C 항온기에서 3일 정치한 후 종자의 발아 상태를 대조구와 비교하였다.

#### 라. 곰팡이 성장 억제 분석

Strain O6에 의해 *Fusarium oxysporum*의 성장억제는 PD agar 배지에서 실행하였다. Wild type O6는 30 $\mu$ g/ml의 streptomycine을 첨가하여 PD agar에서 배양하였다. 곰팡이 *F. oxysporum*은 Potato Dextrose Agar (Potatoes, infusion from, 200g, Bacto Dextrose, 20g, Bacto Agar, 15g, distilled water 1L)에 접종하여 상온에서 3일 배양하였다. PDA에서 자란 곰팡이의 균사를 다시 petri plate 중앙에 다시 접종하고 3일 후에 미리 LB agar에서 배양한 각 strain들을 10 $\mu$ l씩 접종하고 상온에서 7일 배양하였다.

#### 마. O6균주의 생물적 방제에 관련된 유용형질 검정

O6균주의 여러 가지 생물적 방제에 관련된 유용형질 생성 여부를 확

인하기 위해 hydrogen cyanide, protease, homoserine lactone, siderophore 생성을 검정하였다. 공시 균주들을 16시간 동안 30℃ LB 배지에서 배양한 후 각 strain들을 4.4g/L의 glycine을 첨가한 King's B배지에 접종하였다. Cyan-tesmo HCN indicator paper (Gallard-Schlesinger Industries, USA)를 petri dish의 뚜껑 안쪽에 붙였다. Plate를 parafilm (American National Can™, USA)으로 봉합을 하고 30℃에서 48시간 동안 배양하였다. 이 실험에서 positive control로는 HCN을 생산하는 것으로 알려진 *P. aureofaciens* strain 30-84와 negative control로는 *P. fluorescens* strain 2-79를 사용하였다. HCN이 생산되지 않으면 indicator paper의 색 변화가 없으며, 파란색으로 변하는 것으로 strain이 HCN을 생산한다는 것을 결정하였다.

Protease 생산 실험은 Yest Extract-Skim Milk 배지 [Skim milk (Difco) 10g, Yeast extract 1g, agar 15g, distilled water 1L]에 LB 배지에서 overnight 배양한 각 strain들을 접종한 후 30℃에서 48시간 배양한 후 strain 주위의 halo를 관찰하였다.

Homoserine lactone의 검정방법은 각 strain과 test strain인 *Chromobacter violacearum* CV026 (McClellan et al., 1997)의 돌연변이체를 LB broth, 30℃에서 16시간 배양하였다. 각 strain을 LB agar plate에 streaking한 후 그 위에 다시 수직 방향으로 test strain을 streaking하여 30℃에서 24시간 배양한 후에 test strain의 색 변화로 HSL 생산여부를 관찰하였다.

Siderophore 생산은 Chrome Azurol S plate를 사용하여 분석하였다. 이 CAS 배지는 30 ml의 물에 10mM HCl과 35 mg의 Chrome Azurol S (Sigma Chemical, USA)를 녹인 후에 1 mM FeCl<sub>3</sub> 6.2 ml을 넣어서 만들었다 (Schwyn and Neilands, 1987). 이 CAS 배지에 각 strain을 5 μl씩 접종한 후 30℃에서 48시간 배양 후에 halo를 측정하였다.

#### 바. O6 균주의 ISR 유도 능력 검정

O6 균주의 전신유도저항성 유도 능력 검정은 오이와 담배를 이용하여 실시하였다. 오이 (백성2호 품종)종자를 클로락스와 70% ethanol을 이용하여 표면 살균하고, 멸균수로 여러 번 세척하여 멸균된 상토에 파종하였다. 파종된 오이 종자는 growth chamber에서 2주 동안 키운 후, LB 배지에서 48시간 배양한 *P. chlororaphis* O6배양균을 회수하여 멸균수로 OD<sub>600nm</sub>=0.4로 조절하여 30 ml씩 오이 식물체에 분주한 후 1주일을 더 성장시켰다. 10<sup>5</sup> spores/ml의 오이 갈반병균인 *Corynespora cassiicola* CM2000-1 (Kwon, 2002)을 접종하여

30 °C의 dew chamber에서 12시간동안 처리한 3일 후에 잎에 발생하는 병반수를 조사하였다. 갈반병 *Corynespora cassiicola*는 Czapek solution agar (CSA; Difco)를 사용하여 28 °C에서 2주 동안 배양한 후, 기중균사를 흐르는 수돗물에서 멸균한 붓으로 제거한 후 건조시켰다. 그 후 형광등이 조사되는 항온기 (25 °C)내에 6일간 배양한 후 형성된 분생포자를 멸균수로 회수하여 사용하였다.

담배 (Xanthi 품종) 종자를 70% ethanol로 2분 담그고, 1% sodium hypochlorite에 30분간 담가서 표면 살균하고, 멸균수로 여러 번 세척하여 10 ml 1/2 MS medium이 담긴 microtiter plates (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA)에 파종하였다. 종자는 14시간 광 조건과 25 - 28 °C의 성장상에서 생육시켰다. 파종 후 2 주 후에 King's medium B에서 36시간 생육시킨 O6 균주를 원심분리하여 회수한 다음 멸균수로 약  $1 \times 10^8$  cfu/ml 이 되게 희석한 균 현탁액을 한 식물의 뿌리에 10  $\mu$ l씩 접종하였다. O6균 접종 후 1주일 후에 LB 배지에서 28 °C에서 36시간 배양한 식물 무름병균인 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SCC1균주를 멸균수에 약  $1 \times 10^8$  cfu/ml 이 되게 현탁하여 각 담배 잎에 5  $\mu$ l씩 접종하고 2일 후에 식물의 무름 증상 유무를 관찰하여 O6균주에 의한 식물병 저항성 유도 능력을 검정하였다.

#### 사. O6균주에 의한 식물생장촉진능력 및 CMV에 대한 ISR 능력

담배 (*Nicotiana tabacum*cv. Xanthi-nc)에 O6균주를 상기의 항 7에 의해 생육시키고 균주를 접종한 후, 1주일 후에 잎 전체 면적 (total leaf surfaces), 줄기의 직경 (stem diameter), 그리고 shoot fresh weight를 측정하여 담배 생육 촉진 효과를 측정하였다. 본 연구에 사용된 담배 종자는 Dr John Ryals, (Novartis, Research Triangle Park, NC, USA)에게서 분양받아 사용하였다. 다른 처리 구들 : 물처리구를 대조구 (control), 1 mM salicylic acid (Sigma, St Louis, USA), 또는 1 mM 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) (Sigma, St Louis, USA)를 균 대신 처리 하여 비교하였다.

바이러스에 대한 O6균주의 식물병 저항성 유도 능력 검정을 위해 CMV subgroup I strain Fny을 본 연구에 사용하였고, 바이러스의 보존이나 담배에의 접종은 Dr. Murphy의 방법에 준하여 사용하였다. CMV 접종원은 담배 Kentucky 14 전신 감염된 잎을 1g을 10 ml의 50 mM potassium phosphate buffer containing 10 mM sodium sulfite (pH 7.0)에 마쇄하여 준비하였다. 모든 경우에 각 처리구당 20개의 담배에 물리적으로 CMV를 처리하였



으며, 같은 처리구를 2번 반복하였다. 각 담배의 처음 3개 잎에는 CMV를 문지르기 전에 carborundum를 가볍게 살포하였다. 병 발생 심각도는 다음의 기준에 의해 CMV 접종 후 14과 28일 후에 측정하였다 : 0= no symptoms, 2=mild mosaic symptoms on leaves, 4= severe mosaic symptoms on leaves, 6= mosaic and deformation of leaves, 8=severe mosaic and severe deformation of leaves, and 10= severe mosaic and deformation with stunted growth. 접종된 잎에 CMV 집적량을 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)에 의해 측정하였다. 각 식물체는 CMV 접종 후 14일과 28일 후에 접종하지 않은 잎과 3개의 새로운 잎으로부터 샘플을 취하여 50 mM carbonate buffer, pH 9.6, at a ratio of 1:25 (w/v)로 마쇄하였다. ELISA 방법은 일반적으로 잘 알려진 방법에 의해 사용하였다. 건강한 식물체의 평균 + 3 standard deviations보다 흡광도의 수치가 (405nm)가 높을 때 CMV가 존재하는 샘플로 간주하였다. 각 ELISA test는 정제된 CMV의 알려진 농도로 표준 곡선을 그려 산출하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. *P. chlororaphis* O6균주의 이차 대사 산물 생산 능력

*Pseudomonas chlororaphis* strain O6는 *Fusarium oxysporum*을 포함한 일부 곰팡이에 대해 길항능력을 보였으며, phenazine, hydrogen cyanide (HCN)와 protease와 같은 곰팡이의 생육을 억제하는 이차 대사 산물을 생산하였다. *P. chlororaphis* strain O6가 생산하는 Phenazine의 종류를 알아보기 위해 TLC에 의해 확인해 본 결과, O6균주는 phenazine-1-carboxylic acid (PCA), 2-hydroxy-phenazine-1-carboxylic acid (2OHPCA)와 2-hydroxy-phenazine (2OHPhz)을 생산하였다 (data not shown). 지금까지 보고된 바에 의하면 Phenazine 생성 균주는 밀과 같은 종자의 발아를 억제한다는 보고가 있어서 O6균주의 보리 및 벼 종자 발아억제 능력을 검정해 본 결과 O6균주는 보리의 발아 억제 능력을 보였으나, 오이와 같은 다른 종자의 발아 억제 능력은 없었다 (data not shown). 보리 종자에 접종된 균 농도는  $10^8$  cfu/seed이었다. 다른 phenazine 생성 균주인 30-84를 종자에 처리한 종자 발아율은 다른 처리구보다도 종자발아율이 훨씬 낮았고 약 평균 18%의 발아율을 나타냈다 (Fig. 1). 물을 처리한 대조구의 보리종자 발아율은 98%로 대부분이 발아가 되었으며, *E. coli*를 처리한 종자 발아율은 88%를 보였다. 26%와 18%로 종자

발아율이 낮았던 phenazine 생성 균주인 O6와 30-84균주는 보리 발아 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 1).

Positive control *P. aureofaciens*를 Cyantesmo HCN indicator paper로 처리하였을 때와 마찬가지로 O6균주는 HCN을 생성하여 indicator paper를 사용하였을 때 파란 색으로 변하였으나, Negative control *P. fluorescens* strain 2-79에서 indicator paper를 사용했을 때 HCN을 생산하지 못하기 때문에 색깔은 변하지 않았다 (Table 1).

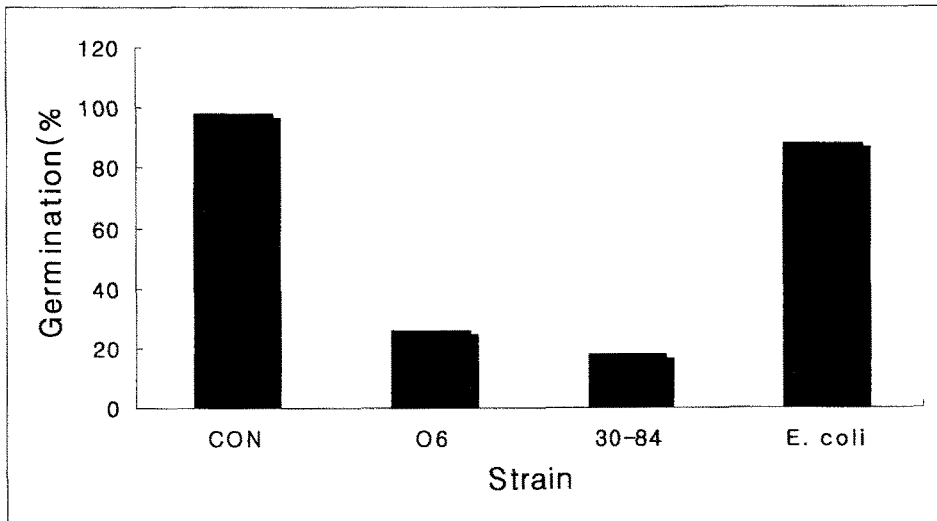


Fig. 1. Germination rate of barley seeds treated with *P. chlororaphis* strain O6, N7 mutant and Org mutant.

O6균의 식물 병원 곰팡이 생육 억제 능력을 검정하기 위해 곰팡이 *Fusarium oxysporum*과 대치 배양한 결과 O6균주는 2~5cm 정도 균사 생육을 억제하였으나, *E. coli* 대조구는 균사 생장을 억제하지 못하였다 (Table 1). O6균주의 protease 생산은 Skim milk 배지에서 관찰한 결과, 8~10cm의 halo를 나타내었다 (Table 1). 그람 음성균의 여러 신호 전달체계에 관여하는 신호물질로 알려진 homoserine lactone 생성 유무를 확인하여 본 결과, O6균주는 test strain *Chromobacter violacearum* CV026의 색이 purple로 변하여 HSL을 생산하는 것으로 추정되었다. Test strain인 *Chromobacter violacearum* CV026은 HSL을 생성하는 유전자를 돌연변이 시킨 것으로 외부에서 HSL을

공급해 주면 purple pigment를 생성한다. O6균주가 철 흡수에 관여하는 siderophore 생산 유무를 CAS배지에서 확인해 본 결과 O6균주는 약 4-5 cm의 halo를 생산하여 siderophore를 생산하였다.

#### 나. O6균주의 전신희독저항성 유도 능력

본 연구에 사용된 *P. chlororaphis* O6균주의 식물병 저항성 유도 능력을 조사하기 위해 먼저 오이 (백성 특호)를 이용하여 최근 문제되고 있는 오이 갈반병균 (*Corynespora cassiicola*)에 대해 병 저항성 유도 능력을 검정하였다. 물을 처리한 대조구는  $77.3 \pm 21.7$  갈반병 발생율을 보였으나, O6균주를 먼저 접종한 식물체에서의 오이 갈반병 발생율은  $19.3 \pm 12.4$ 로 현저히 감소하여 O6 균주에 의해 오이 갈반병에 대한 식물병 전신희독저항성이 유도되었다 (Fig. 2). O6균주에 의해 갈반병 발생율만 감소한 것이 아니라 O6균주를 처리한 오이에서 발생한 갈반병의 병반 크기도 대조구에 비해 현저히 적어서 발생을 뿐만 아니라 발병 심각도도 감소시켰다 (data not shown).

담배를 이용한 식물 병원세균인 무름병균 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SCC1에 대한 병 저항성 유도 여부를 확인해 본 결과, 병 저항성 chemical inducer라고 알려진 BTH나 지금까지 병 저항성 유도 능력이 우수하다고 알려진 다른 토양 서식균 (90-166, 89B61)보다 무름병에 대한 병 저항성 유도 능력이 뛰어난 것을 확인하였다 (Fig. 3).

O6균주가 식물 곰팡이 병원균과 세균병원균이외에 난 방제병인 바이러스 병에도 병 저항성이 유도되는지를 알아보기 위해 CMV를 접종하여 유도전신 저항성 능력을 알아본 결과, GX3에서는 CMV의 병 발생율이 O6균주를 처리한 담배에서 대조구보다 적었으나 유의성이 없었으나, 담배 Samsun에서의 CMV 병 저항성 유도 능력은 chemical inducer인 BTH와 같은 정도의 높은 CMV 병 억제 능력을 보였다 (Fig. 4). 따라서 O6 균주에 의한 바이러스 병 저항성 유도 능력은 품종에 따라 차이가 있지만, 바이러스 병에 대해서도 병 저항성 유도 능력이 확인되었다. 이러한 결과는 ELISA에 의한 CMV 바이러스의 잎에 집적에 따른 조사 결과에 의해서도 확인되었다. (Table 2).

Table 1. Phenotypes of *P. chlororaphis* O6 related to biocontrol

Strains	phenotype					
	Phenazine (mm)	HCN (mm)	Protease (mm)	Siderophore (mm)	HSL	<i>Fusarium oxysporum</i>
O6	+	+	8~10	4~5	+	+

+ : produced or inhibited, - : did not produce or did not inhibit

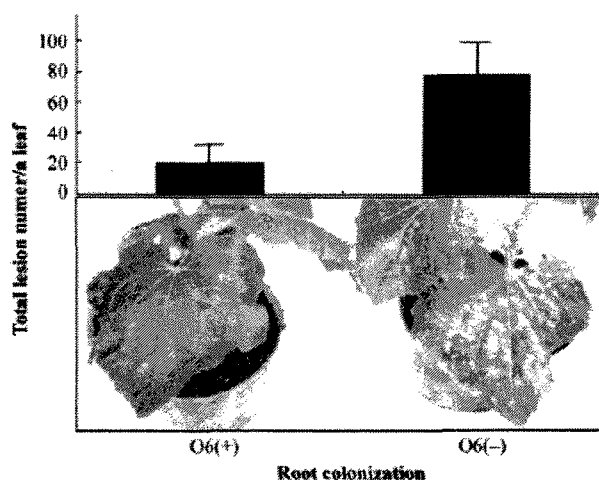


Fig. 2. Protection from a foliar target leaf spot disease caused by *C. cassicola* in cucumber leaves of plants with roots colonized by *P. chlororaphis* O6. Plants with ISR were raised from seeds coated with O6 cells [O6(+)] suspended in 0.0.2M phosphate buffer (pH 7.0) and an equal volume of 2 % methylcellulose. Control seeds were coated with the same suspension without O6 cells [O6(-)]. After sowing, 20 ml of the O6 cells in King's B medium [O6(+)] or same volume of cultural medium [O6(-)] were applied once around the seedling, per pot. Disease severity was estimated 4 to 6 days after challenge inoculation by counting the total lesion number produced on the fully expanded 2<sup>nd</sup> leaf. The data are mean numbers ± standard deviation [77.3 ± 21.7 for O6 (-) and 19.3 ± 12.4 for O6 (+)] analyzed from four different experiments, each consisting of 10 plants.

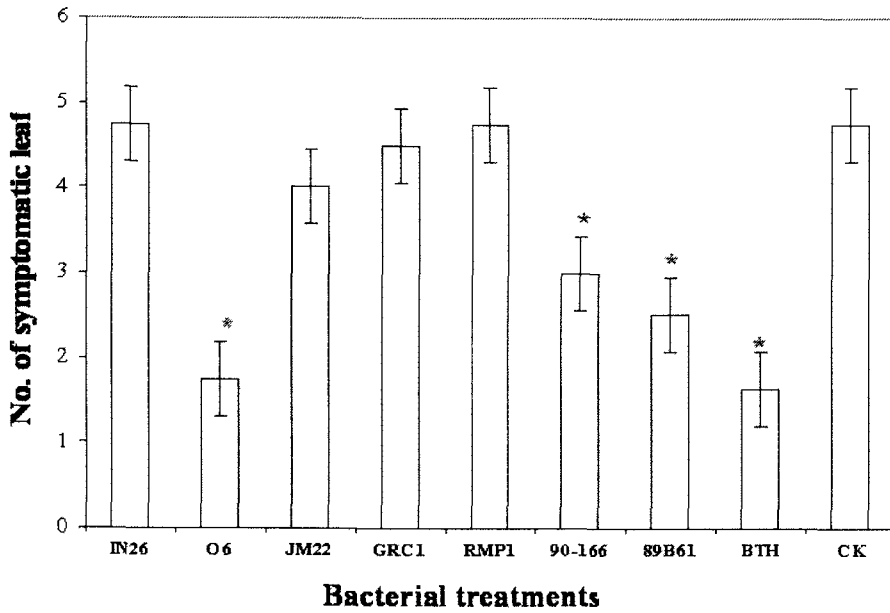


Fig. 3. Induced resistance against *Erwina carotovora* SCC1 by rhizobacteria in the tobacco. The values are means of 8 replications. One plant is for one replaication. Pathogen was challenged at 7 post-inoculation of rhizobacteria with dropping of bacterial suspension into 4 weeks old tobacco plants. Rhizobacteria treated with soil-drenching at  $10^{8-9}$  cfu/ml of suspension. \* significantly different from non treated control to Fisher's LSD test at  $P=0.05$

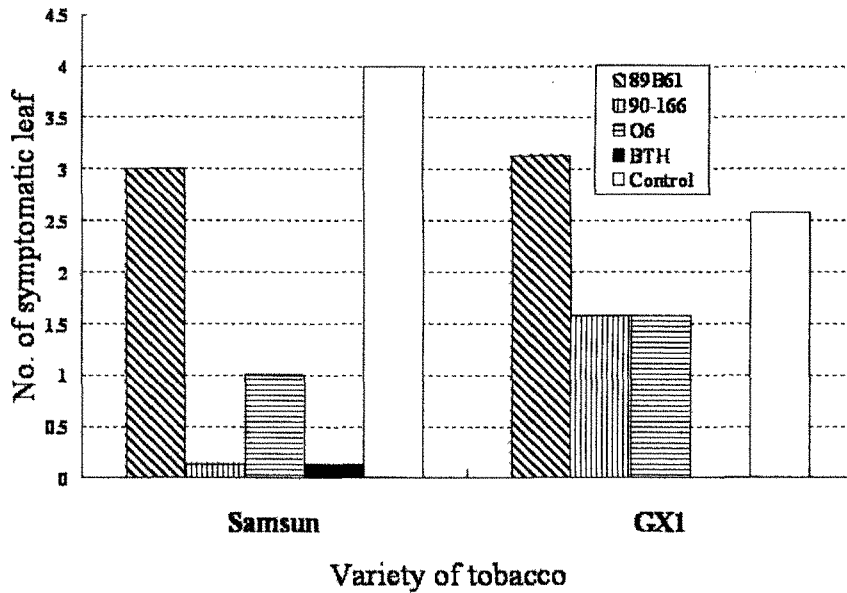


Fig. 4. Effect of rhizobacteria on induced systemic resistance against *Cucumber mosaic virus* in two tobacco varieties (Samsun and GX1) two weeks after CMV inoculation.

Table 2. Induced systemic resistance against *Cucumber mosaic virus* by *Pseudomonas chlororaphis* O6 in tobacco plants.

Treatment	ELISA value (405 nm)	
	Samsun	GX1
O6	0.29b	0.32b
1mM BTH	0.11a	0.11a
Control	0.50c	0.47c
Mock	0.10a	0.11a

8 replications per treatment. Different letters indicate significant differences between treatments according to LSD at  $P = 0.05$ .

## 제 2 절 Tn5 돌연변이에 의한 *P. chlororaphis* O6균주의 Induced Systemic Resistance (ISR) 유도 능력 상실 돌연변이주 선발 및 특성 분석

### 1. 서 언

제 1 절의 결과에 의하면 *Pseudomonas chlororaphis* O6는 식물 병원 곰팡이의 생육을 억제하는 여러 가지 이차대사 산물을 생산하며 또한 광범위한 식물병에 대해 유도전신저항성 (Induced Systemic resistance, ISR)을 유발하는 토양 서식균이었다. 지금까지의 결과에 의하면, ISR을 유도하는 토양서식균의 lipopolysaccharide, siderophore, phloroglucinol, salicylic acid, 그리고 butanediol과 같은 물질들이 식물에서 병 저항성을 유도하는 물질이라고 알려져 있다. 그러나 아직까지 ISR 돌연변이체등을 이용한 이러한 물질이 직접적으로 병 저항성 유도에 관련되어 있다고 알려진 바는 없다. 따라서 *P. chlororaphis* O6균주가 지니고 있는 식물병 저항성 유도에 관련된 유전자를 선발하기 위해 본 절에서는 transposon인 Tn5를 이용하여 ISR 유도 능력이 상실된 돌연변이주들을 선발하고 각 돌연변이주들의 Tn5 flanking sequence 분석에 의해 ISR 유도 능력에 관련된 유전자들을 선발하고 각 돌연변이주들의 특성을 분석하였다.

### 2. 재료 및 방법

#### 가. 공시균주 및 배양

본 실험에서 사용한 각 균주의 특징은 Table 1.에 기술하였다. 모든 *E. coli*는 37 °C에서 LB 배지 (Bacto-trypton 10g, Bacto-yeast extract 5g, NaCl 10g, distilled water 1L, pH 7.5)에 배양시켰고, 생물 방제균 *P. chlororaphis* O6와 Tn5 mutant는 30 °C에서 LB배지를 사용하였고, 필요에 따라 King's medium B (Protease peptone No.3 20g, Agar 15g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.5g, Glycerol 10 ml, distilled water 1L, pH 7.2 ± 0.2 25 °C) 배지를 사용하였다. 선별 과정에서 배지에 첨가하는 항생물질은 Tetracycline (12.5 µg/ml), Ampicillin(50 µg/ml), Kanamycin(100 µg/ml)을 사용하였다 (Sambrook and Russell, 2001). 본 실험에 사용한 모든 균주는 -80 °C에 보관

하여 사용하였다.

Table 1. Characteristics of the bacterial strains and plasmids used in this work.

Strains or Plasmids	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Source or reference
<i>P. chlororaphis</i>		
O6	Wild-type, ISR <sup>+</sup> , St <sup>r</sup>	This study
Tn5 mutants	GacS::Tn5, ISR <sup>-</sup> , Km <sup>r</sup> , St <sup>r</sup>	This study
<i>E. coli</i>		
LE392	Host strain	Promega Corp.
DH5a	Host strain	Sambrook(2001)
Plasmids		
pRK2073	Helper plasmid, Mob <sup>+</sup> , Tc <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup>	Leong(1982)
pRL1063a	Tn5::luxAB, transposon, Km <sup>r</sup>	Wolk(1991)
various constructs	Various sizes of <i>EcoRI</i> fragment containing partial genomic fragment and Tn5::luxAB fragment	This work

<sup>a</sup>Abbreviations: ISR, Induced systemic resistance; Km<sup>r</sup>, kanamycin resistance; Am<sup>r</sup>, ampicillin resistance; Sp<sup>r</sup>, spectinomycin resistance; Mob<sup>+</sup>, mobilizing plasmid; St<sup>r</sup>, streptomycin resistance

#### 나. Tn5 돌연변이

Tn5를 가지고 있는 plasmid pRL1063a와 wild-type *P. chlororaphis* O6와의 conjugation에 의해 Tn5 삽입 돌연변이주를 선발하였다. Conjugation의 방법은 donor strain인 *E. coli* pRL1063a와 helper plasmid pRK 2073은 37 °C에서, recipient strain인 *P. chlororaphis* O6를 LB broth에 접종하고, 28 °C에서 16시간 배양 한 다음 원심분리하고 1ml의 10 mM MgSO<sub>4</sub>로 현탁한 후 *E. coli*와 helper plasmid를 10 : 1 비율로 혼합한 후 30 µl씩 LB agar plate에



접종한 후 37 °C에서 1시간 정도 배양하였다. Mating plate에 recipient cell을 30  $\mu$ l spot 중앙에 20  $\mu$ l 접종한 후 28 °C에서 24시간 배양하였다. 배지 표면에 있는 cell을 1 ml LB broth로 현탁액을  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ 으로 희석한 후 0.1 ml씩 kanamycin (100  $\mu$ g/ml)이 함유된 LB agar plate에 도말하여 28 °C, 48시간 배양하여 transconjugant를 선발하였다.

#### 다. Tn5 돌연변이주 ISR 유도 능력 검정

각 *P. chlororaphis* O6균주의 Tn5돌연변이주의 ISR유도 능력 검정은 제 1절의 재료 및 방법에 기술한 기주 식물로는 담배 (*Xanthi* 품종)를 표면 살균하여 10 ml 1/2 MS medium이 담긴 microtiter plates (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA)에 파종하였다. 파종 후 2주 후에 King's medium B agar plate에서 36시간 생육 시킨 O6 균주와 각 Tn5 돌연변이주들을 멸균수로 약  $1 \times 10^8$  cfu/ml이 되게 현탁하여 각 균주 당 3개의 담배 뿌리에 10  $\mu$ l씩 접종하였다. 균주 접종 1주일 후에 LB 배지에서 28 °C에서 36시간 배양한 식물 무름병균인 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SCC1균주를 멸균수에 약  $1 \times 10^8$  cfu/ml이 되게 현탁하여 각 담배 잎에 5  $\mu$ l씩 접종하고 2일 후에 식물의 무름 증상 유무를 관찰하여 ISR 유도 능력이 감소되거나 상실된 돌연변이주들을 선발하였다.

#### 라. Southern blot analysis

ISR 유도 능력이 상실된 각 돌연변이주들의 Tn5-*luxAB*의 삽입 여부를 확인하기 위하여 Southern hybridization을 실시하였다. Total genomic DNA는 hexadecyltrimethyl-ammonium bromide(CTAB) 방법에 의해 분리하였다 (Ausubel et al., 1989). 각 균주를 LB Broth에서 배양한 후 5000rpm에서 5분 동안 원심하여 침전된 세균 세포를 회수한 후 20%(v/v) glycerol로 씻었다. 침전된 세균 세포를 9.5 ml TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) buffer로 현탁하고 0.5 ml 10% SDS로 분해하였다. 50  $\mu$ l proteinase K (20 mg/ml)로 단백질을 제거하였다. Exopolysaccharide 같은 물질들을 제거하고 DNA를 정제하기 위하여 1.8 ml 5M NaCl과 1.5 ml CTAB/NaCl solution을 첨가하여 혼합하고 동량의 chloroform/isoamylalcohol (24:1)을 첨가하여 20분간 5,000 rpm에서 상층액을 회수하였다. 그리고 나서 상층액으로부터 DNA를 isopropanol을 첨가하여 침전시키고, 70% ethanol로 씻고 건조하여 TE buffer

에 녹여 사용하였다.

Southern hybridization을 하기 위하여 kanamycin을 가지고 있는 pRL648에서 0.9Kb *Xba* I - *Bam*HI fragment의 Tn5를 분리하여 probe로 사용하였다. Tn5 probe는 nonradioactive digoxigenin system (Boehringer Mannheim, USA)을 이용하여 random priming labelling하였다. CTAB의 방법으로 Tn5 mutant로부터 total DNA를 분리하여 여러 제한 효소로 완전 절단하고 0.7% agarose gel상에서 전기영동 하였다. 전기영동은 Sambrook의 방법(2001)에 준하여 실험하였다. DNA는 전기영동 한 positively charged nylon membrane (Boehringer Mannheim, USA)으로 alkaline blotting에 의해 옮겼다. 잔해를 제거하기 위해 membrane을 20×SSC (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH7.0)에서 2×SSC로 희석하여 건조시켰다. 이 membrane을 prehybridization buffer [50 ml 50%(v/v) formamide, 25 ml 5×SSC, 1ml 0.1%(w/v) N-lauroylsarcosine, 200 μl 0.2%(w/v) SDS, 5g 5%(w/v) blocking reagent (Boehringer Mannheim, #1096176)]에서 2시간 55 °C에서 반응시켰다. 이 membrane을 Tn5 probe가 포함된 hybridization buffer와 함께 overnight 시켰다. 이 membrane을 상온에서 5 ml 2×SSC와 0.1%(w/v) SDS를 각각 2번씩 씻었다. 이것을 다시 15분 65 °C에서 50 ml 0.1×SSC와 0.1%(w/v) SDS로 씻었다. Membrane을 anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate를 처리한 후, chemiluminescent 방법을 사용하여 detection하였다. Chemiluminescent 방법에 의한 immunological detection된 membrane을 Lumi-phos 530 (Boehringer Mannheim, USA)에 적신 후 acetate film 사이에서 30분 37 °C에 반응시킨 후 상온에서 X-Ray film (Boehringer Mannheim, USA)에 노출시켰다. 이 film을 developer에서 4분 동안 반응시킨 후 30초 동안 stop bath에 반응시키고 fixer에 2분, running top water에서 10분 반응시켜 현상하였다.

마. 각 ISR 돌연변이주들의 Tn5-flanking region 클로닝

본 연구에서 transposon으로 사용된 pRL1063a는 transposon내에 *luxAB*를 reporter유전자로 가지고 있고 또한 replicon을 함유하고 있어 transposon을 자르지 않은 제한 효소로 절단 후 ligation을 하면 plasmid로서 대장균에서 복제가 가능하다. 따라서 모든 ISR 돌연변이주의 genomic DNA를 상기의 방법에 의해 선발한 다음 각 genomic DNA를 transposon을 자르지 않은 *Eco*RI을 이용하여 전달하고, 상기의 방법에 의해 pRL1063a의 kanamycin 유전자의 fragment를 probe로 southern hybridization을 수행하였다. 각 돌연변

이주의 genomic DNA 중에서 probe와 hybridization되는 크기의 *EcoRI* fragment를 agarose gel에서 분리, 정제하여 DNA ligase를 이용하여 self-ligation하여 각 돌연변이주들의 genomic DNA를 *E. coli* DH5a에 형질전환하였다. 각 돌연변이주의 Tn5 flanking fragment와 Tn5-Lux fragment를 지닌 clone들을 kanamycin이 첨가된 LB agar 배지에서 선발하였다.

각 돌연변이주에서 분리된 clone들은 plasmid를 정제하여 각 clone들의 Tn5 flanking 염기 서열을 전남대학교 기초과학지원연구소 광주분소에 의뢰하여 Perkin Elmer사의 자동 염기 서열 분석기 (ABI PRISM 377)로 분석하였다. 염기 서열 분석 시에 이미 알려진 transposon pRL1063a의 IS element에서 primer를 조제하여 염기 서열 분석에 사용하였다. 각 돌연변이주에서 얻어진 염기서열들은 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 GeneBank database와 BLAST network service를 통해서 분석하였고, ExPASy-translate tool (<http://kr.expasy.org/tools/dna.html>)에서 아미노산 서열로 변형 후 amino acid sequence의 상동성을 blast search에 의해 비교하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. *P. chlororaphis* O6의 ISR 유도 능력이 상실된 돌연변이주 선발

O6균주의 ISR 유도 능력에 관련된 유전자들을 선발하기 위해 transposon인 pRL1063a를 이용하여 돌연변이주 library를 조제한 후, 각 돌연변이주들을 담배와 무름병균을 이용하여 bioassay를 실시하였다 (Fig. 1). 약 20,000개 이상의 돌연변이주를 screening하여 최종 32개의 ISR 돌연변이주들을 선발하였다 (Fig. 2).

각 ISR 능력이 상실된 돌연변이주들로부터 total genomic DNA를 분리하고 transposon을 자르지 않은 제한효소 *EcoRI*로 처리한 후, self-ligation하여 대장균에 형질 전환하였다. 본 연구에 사용된 transposon은 transposable element 내에 replicon을 가지고 있어서 돌연변이주의 genomic DNA를 제한 효소로 절단한 후, self ligation하였을 때 대장균내에서 복제할 수 있다. 이러한 방법으로 ISR유도 능력이 상실된 32개 모두의 돌연변이주들의 transposon이 삽입된 부위의 O6유전자를 cloning하고 여러 단계의 sub-cloning을 통해 각 돌연변이주들의 Tn5 flanking 부위를 sequencing하였다. 이러한 과정의 한 예로 O6의 ISR 돌연변이주 중의 하나인 N7을 예로 들어

transposon이 들어 있는 restriction map과 sequencing 결과를 나타내었다.  
(Fig. 4)

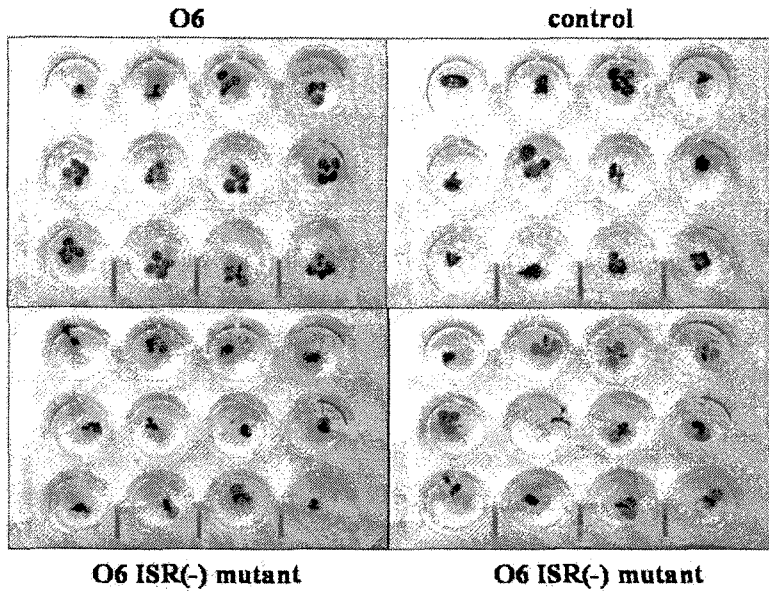


Fig. 1. Isolation of Tn5 mutants lacking induced systemic resistance ability of *P. chlororaphis* O6. ISR activity of *P. chlororaphis* O6 was measured against a soft rot pathogenic bacterium, *Erwinia carotovora* SCC1 in microtiter system. Suspension of *E. carotovora* was inoculated on leaves of four week old tobacco plants which previously inoculated with bacterial strains and water as a control

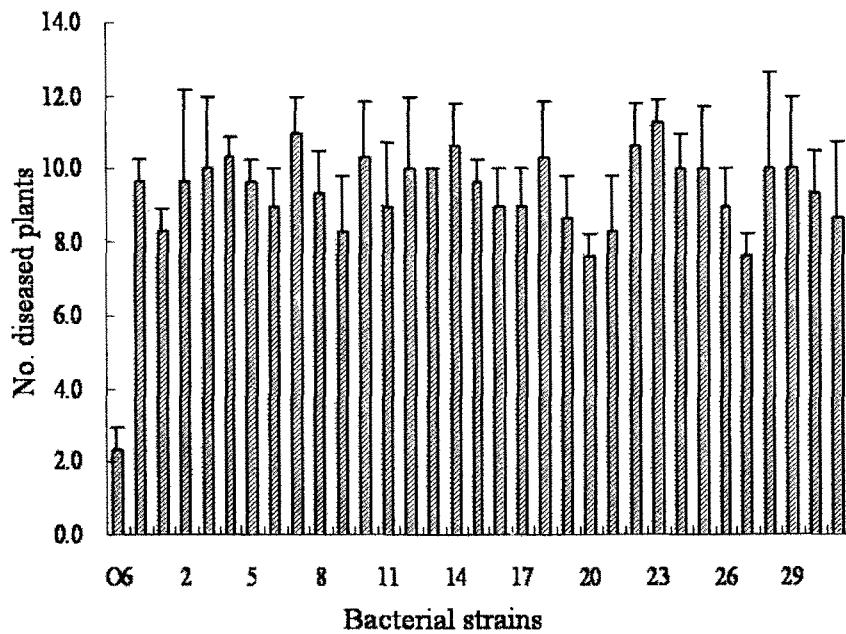


Fig. 2. Resistance induced in tobacco plants grown in MS medium treated at the root level with cells of *P. chlororaphis* O6 and Tn5-derived mutants. Suspension of *E. carotovora* was inoculated on leaves of four week old tobacco plants which previously inoculated with bacterial strains and water as a control. Protection is expressed as a number of leaves showed soft rot symptoms. Data are means of two experiments each with 10 inoculated plants.

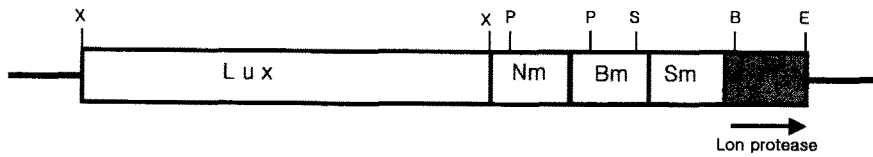


Fig. 3. Restriction map of plasmid pLON of 3.5Kb *Xba*-*EcoR* I fragment containing the Tn5-flanking sequence from pN7. Restriction enzymes; E, *EcoRI*; X, *Xba*I ; B, *Bam*HI; P, *Pst*I; S, *Sal*I; Nm, neomycin; Bm, bleomycin; Sm, streptomycin.

ISR 능력이 상실된 돌연변이주 N7의 Tn5 flanking sequence를 분석해 본 결과, N7 돌연변이주에서 Tn5는 여러 bacteria의 ATP-dependent protease 상동성을 보인 유전자에 삽입되어 있음을 알 수 있었다 (Fig. 4). 돌연변이주 N7의 Tn5 flanking sequence는 *P. aeruginosa* strain PA01의 ATP-dependent protease의 778 amino acid 중 C-terminal의 429 amino acid 부터 630 amino acid와 유사하였으며, 197 amino acid 중 178 amino acid가 동일하여 90%의 높은 상동성을 보였다. 또한 다른 Gram negative bacteria인 *Thermotoga maritima*의 ATP-dependent protease LA와 198 amino acid 중 75 amino acid가 동일하여 37%, *Vibrio cholerae*는 36%, *Escherichia coli*의 Lon protease (*lon*)와의 상동성은 200 amino acid 중 60 amino acid가 동일하여 30%의 상동성을 보였다 (Fig. 5).

일반적으로 ATP-dependent protease (Lon protease)는 필요하지 않은 단백질의 축적을 방지하기 위해서, 또는 아미노산의 재이용을 용이하게 하기 위해서, 언제나 모든 세포에서 불필요한 단백질을 분해 한다. 분해는 선택적인 과정으로서 모든 개개의 단백질의 수명은 분해를 위한 전문화된 단백질 분해 시스템에 의해서 조절되고 있다. 이것은 번역후의 프로세싱 때에 일어나는 단백질 분해와는 대조적이다. Lon protease에 의해 분해되어지는 조절단백질들은 strain O6을 포함해서 모든 생물체에서 유전자들의 발현을 조절하는 기작으로 중요한 역할을 할 것으로 생각되어 진다. 예를 들어 세균에서 proteolysis는 regulatory transcription factor에 대해 중요한 역할을 한다. 즉 heat shock 반응, stationary-phase와 SOS stress 반응, capsular polysaccharide 생합성을 조절하고, phage  $\lambda$ 의 lysis-lysogeny decision을 조절한다 (Gottesman, 1996). 또한 여러 비정상적인 단백질을 분해하는데 관여하는데 이러한 것으로는  $\lambda$  N protein, SulA 세포 분열 regulator, capsule 합성의 positive regulator인 RcsA등이 있다 (Gottesman, 1996).

▼ transposon 삽입부위

ttgcaggatccggacttccaggaatgttccgcgtgctggaggacttcgacgaagacatc  
L Q D P D F Q E M F R V L V D F D E D I  
ccgatggaggacgaaagcctcgaacagttcgcccagctgctgaaaactcgcacctccgaa  
P M V D E S L E Q F A Q L L K T R T S E  
gaaggcatggcgccgctgaccgcggacgcggtggcacgcctggcgacctatagcgcccgg  
E G M A P L T A D A V A R L A T Y S A R  
ctggcggaaacaccagggcgcttgtcggcgcgatfggcgatctgtccagctggtcagc  
L A E H Q G R L S A R I G D L F Q L V S  
gaggcggacttcatccgtcacctggcctcggacgagatgaccgatgccgggcatatcgaa  
E A D F I R H L A S D E M T D A G H I E  
cgggcgctcaaagccaaggccaccgtaccgggcgggtctcggcgcggtattctcgacgac  
R A L K A K A T R T G R V S A R I L D D  
atgctggcggggatcattctgatcgacaccgatggcgcgccgctgggcaagtgcaacggc  
M L A G I I L I D T D G A A V G K C N G  
ctgacgggtgctggaagtggcgactcggcctttggtattcggcgcggtattccgccacg  
L T V L E V G D S A F G I P A R I S A T  
gtgtatccggggggcagcggatcgtcgacatcgagcgcgaggtcaatctcggccagccg  
V Y P G G S G I V D I E R E V N L G Q P  
attcactccaagggcgtgatgattctcaccggctacctgggcagccgttacgcgcag  
I H S K G V M I L T G Y L G S R Y A Q

Fig. 4. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the Tn5-flanking region of ISR mutant N7 of *P. chlororaphis* O6.

*P. chloro.* N7 2 QDPDFQEMFRVLVDFDIEDIPMVDESLEQFAQLLKTRTSEEGMAPLTADAVARLATYSARL 61  
*P. aeru.* 1434 .....LGED.....SGA..... 492(90%)  
*T. maritima* 423. . . . .RKL. . . . .IKAE. . . . .WE. . . . .RNELNVQKYVSFISSVCR.KNLPHFDRG. . . . .K.VI.W.AM.N 481(37%)  
*V. cholerae* 433 . . . . .E.S.L. . . . .TA. . . . .ADEM.RDAD.ELHY.RFISSIVHDAN.LHCDRK. . . . .I. . . . .IEH.S.T 491(36%)  
*E. coli* 18 . . . . .QAIFYSE.EDTLQI. . . . .VT.WCRWVFTARHNHLPAPG. . . . .WPI. . . . .IREA. . . . .Y 81 (30%)

*P. chloro.* N7 62 AEHQGRLSARIGDLFQLVSEADFIHRLASDEM TDAGHIERALKAKATRTRGRVSARILDDM 121  
*P. aeru.* 493 .....Q. . . . .NE.VIQL.....Q..... 552  
*T. maritima* 482 .GNSTK. . . . .VF. . . . .IVN. . . . .IV.SGELAR.EGS.V.TSD.VLK.YQ.MEN.RNLLEEK-Y.E. 540  
*V. cholerae* 492 TGD.TK. . . . .LHSAHIAN.LR.SNYVAKQ.NANLIRQI.V.E. . . . .RNQEL.VN.LQQSMMETF 551  
*E. coli* 82 TGE.ET.PLSQWILRQCK. ---VAS.CDGDTFSGEQLNLM.QQREW.E.FLAE.MQ.EI 138

*P. chloro.* N7 122 LAGIILIDTGAAVGKCNGLTVLVGDSAFGIPARISATVYPPGGSGIVDIEREVNLGQPI 181  
*P. aeru.* 553 .....A.....V.V.....S..... 612  
*T. maritima* 541 IKTFLM.EVT.SK.QI. . . . .DL. . . . .HS. . . . .V.VK.T.K. . . . .L.RP.V. . . . .Q. . . . .AD.SGK. 601  
*V. cholerae* 552 VN.TT. . . . .Q.E.V. . . . .I.QV.A.S. . . . .ATS.H. . . . .M.N. . . . .T. . . . .TSY.EGE. . . . .N.D. . . . .GS. 611  
*E. coli* 139 .GEQ. . . . .E.E.ERI.QI.A.S.I.FPGR. . . . .E.S. . . . .CV.HI.DGEFT. . . . .KAE. . . . .GN. 200

*P. chloro.* N7 182 HSKGVMILTGVLGSRYAQ 199  
*P. aeru.* 613 ..... 630  
*T. maritima* 602 . . . . .A.L. . . . .E.F. . . . . 619  
*V. cholerae* 612 . . . . .SA. . . . .S.VFGR 629  
*E. coli* 201 .A. . . . .M. . . . .MQAF.M. 214

Fig. 5. Deduced amino acid sequence alignment of the Tn5-flanking sequence of *P. chlororaphis* N7 with amino acid sequences of Lon protease gene (*lon*) from other microorganisms.



Table 1. Homologous genes of the Tn5 flanking sequences of *P. chlororaphis* O6 ISR-deficient mutants

ISR mutant	Homologous gene (NCBI)	
	Function (gene)	E-value
A4	Unknown function of <i>P. fluorescence</i>	1e-63
A6	Unknown protein PA0690 of <i>P. aeruginosa</i>	9e-80
D6	Unknown	
F3	Unknown	
H10,C12,B12,C7,	Fumarate hydratase class 1 ( <i>ttdA</i> )	1e-14
D3,D9,H3	ABC-type branched-chain amino acid transport	5e-69
B8,D2	ABC-type cobalt transport system	1e-139
C10,D11,E11,H7	Leucine transport protein	1e-43
E2,F1	Phosphatidylglycerophosphatase A ( <i>pgpA</i> )	1e-28
H4,C9,C11,A7	Methyl-accepting chemotaxis transducer ( <i>cheY</i> )	9e-32
G12	HlyD family secretion protein ( <i>hlyD</i> )	6e-53
A5	Preprotein translocase subunit ( <i>secB</i> )	3e-68
A7	Vibrio RTX biofilm	9e-29
B4	AIR synthase ( <i>purN</i> )	3e-92
L21	exopolyphosphatase ( <i>ppx</i> )	7e-17
L12	global antibiotics and cyanide regulator ( <i>gacS</i> )	0
N7	ATP-depended Lon protease ( <i>lon</i> )	e-121

다른 나머지 31개의 ISR 돌연변이주들의 Tn5 flanking sequence를 모두 분석하여 본 결과, *P. chlororaphis* O6균주의 ISR을 유도에 관련된 유전자들을 크게 3개의 category로 구분할 수 있었다 (Table 1). 세균에서 여러 형질을 조절한다고 알려진 *gacS*, *ppx*, 그리고 *lon* 유전자와 같은 global regulator들이 포함되어 있었다. GacS 유전자는 식물병원세균 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a의 병원성 인자나 생물적 방제균 *P. fluorescence* 등에서 항균활성을 지니 2차 대사산물인 Phloroglucinol의 생성들을 조절하는 global regulator로 알려져 있다. GacS 단백질은 세포막에 위치하면서 아직 알려져 있지 않은 environmental stimulus에 의해 자가인산화 (autophosphorylation) 되는 sensor kinase이다. 활성화된 GacS sensor kinase로부터 인산기의 전이에 의해 response regulator인 GacA가 활성화가 된다. 활성화된 GacA가 식물세균의 여러 유용한 형질을 암호화하고 있는 downstream 유전자들이 활성화된다. GacS/GacA two component global regulatory system은 세

포 농도 의존형 신호전달 물질인 acyl-homoserine lactone을 조절하는 조절자이기도 하고 (Pierson, et al. 1998) acyl homoserine lactone은 intermediate signal 물질로서 여러 효소나 이차대사산물들이 Gac system에 의해 조절된다고 알려져 있다 (O'Sullivan and O'Gara, 1992, Sarniguet et al., 1995 and Haas and Keel, 2003).

Lon protease (*lon*)은 세균에서 ATP-의존형 proteases의 4가지 종류 (Clp family [ClpAP and ClpXP], HslVU, 그리고 FtsH)중의 하나로 식물이나 동물에서도 보고된 protease이다 (Gottesman et al. 1992). Lon protease는 이 단백질에 의해 조절되는 유전자의 발현을 조절하는 중요한 조절 단백질의 양을 조절한다. 예를 들어, capsular polysaccharide를 조절하는 RcsA를 Lon protease가 분해함으로써 polysaccharide의 생산을 조절한다 (Torres-Cabassa et al. 1987). 세균에서 Lon protease는 heat shock과 다른 스트레스 상태와 같은 좋지 않은 환경에서 유도되어 stress protease라고도 알려져 있다 (Morimoto et al. 1994). *E. coli*에서는 기능을 상실하거나 변성된 세포내 단백질을 비특이적으로 분해하며, stress에 의해 손상된 단백질을 제거하는 기능 (Laskowska et al. 1996)을 가지고 있으며 최근에서 병원성에도 관련이 된다는 보고 있다.

Polyphosphate는 세포내에서 phosphate의 저장형태이며 에너지원과 ATP substitutes로서 작용한다. 세포내에서 RNA 분해를 억제하여 스트레스나 영양분이 부족한 상태한 stationary phase에서 조절작용을 한다. Exopolyphosphatase (*ppx*)와 exopolyphosphate kinase (*ppk*) 유전자 산물에 의해 세균 내에서의 polyphosphate의 양이 조절된다. *E. coli*에서 *ppx*유전자를 over-expression시켰을 때는 polyphosphate의 양은 거의 감지되지 않을 수준으로 감소하였고, 과산화수소에 대한 저항성은 크게 감소하였다. Polyphosphate는 기아, UV radiation, oxidative stress, 그리고 osmotic stress를 받았을 때 생존에 필요한 50개 이상의 유전자를 활성화시키는데 관여하는 RNA polymerase의 sigma factor인 *E. coli*의 RpoS의 발현에서 관여한다고 알려져 있다.

2번째 그룹의 ISR 돌연변이주는 기본적인 metabolism에 관련된 유전자들이 knock out되어서 식물병 저항성을 유도하는 능력이 상실되었다. 이 group에 포함되는 유전자들로는 fumarate hydratase, ABC-type branched amino acid transport, ABC-type cobalt transport system, leucine transport protein, phosphatidylglycerolphosphate A, methyl-accepting chemotaxis transducer, RTX biofilm, AIR synthase 등과 같이 amino acid transport에 관련된 유전자나, flagella의 운동성에 관련된 chemotaxis transducer와 생체막

(biofilm)의 형성에 관련된 유전자나 purine의 생합성에 관련된 AIR synthase 등에 돌연변이가 유기되어 O6균주의 ISR 능력이 상실되었다. 이 그룹의 돌연변이주들은 아마도 뿌리 정착 능력이 상실되었거나 O6균주의 ISR에 관련된 microbial determinants의 합성에 필요한 영양분의 흡수나 방출에 기인한 결과라고 생각이 된다. 이러한 가능성을 타진하기 위해 일부 ISR 돌연변이주들을 오이 뿌리 분비액에서의 생장 정도를 측정하여 본 결과, 대부분의 ISR 돌연변이주는 오이 뿌리 분비액에서의 생육 정도는 wild-type인 O6균주의 생육과 별 차이를 보이지 않았으나, Leucine transport 유전자가 knock-out된 C10, ABC-type amino acid transport 시스템이 knock out된 돌연변이주인 D2등에서는 세균의 농도가 높지 않아 아마도 오이 뿌리에서 생육 정도가 감소되어 ISR 능력이 상실된 것으로 추정된다. 그러나 E2, A6, C11 돌연변이주의 오이 뿌리 분비액에서의 생육정도는 wild type의 생육정도와 차이를 보이지 않았다 (Fig. 8). 따라서 대부분의 ISR-deficient 돌연변이주들은 오이 뿌리 분비액의 생육에서는 차이를 보이지 않아 아마도 오이 내에서 뿌리 정착 능력 이외에 ISR 유도에 관련된 기능이 상실된 결과라고 생각이 든다. 이러한 결과를 종합해 보면, *P. chlororaphis* O6균주의 ISR 유도 능력은 아주 복잡한 신호전달체계와 다양한 유전자들이 관여하여 발현되는 것으로 추정되며, 어느 한 가지 microbial determinant에 의해서 이루지다고 보여지지 않고 한 개 이상의 microbial determinant가 작용하여 ISR 유도 능력이 발현되는 것으로 추정된다. 왜냐하면 ISR 돌연변이주중에서 어느 돌연변이주도 microbial determinant로 작용할 수 있는 structural 유전자가 knock out된 돌연변이주가 선발되지 않았기 때문이다.

일부 ISR 유도 능력 상실 돌연변이주들의 phenotypes을 wild type과 비교하기 위해 wild-type O6균주가 생산한다고 알려진 여러 가지 이차 대사산물의 생산 여부 등을 조사하였다 (Table 2). 여러 ISR 돌연변이주에서 이차 대사 산물이나 HSL과 같은 신호전달물질의 생산이 상실된 표현형을 보여주어 O6균주의 ISR 유도 능력은 아직 알려지지 않은 복잡한 신호전달체계에 의해 조절되는 것으로 사료되며, 본 연구에서 분리된 여러 가지 ISR상실 돌연변이주들은 앞으로 미생물의 병 저항성 유도 인자를 밝히고 그 작용 기작 및 신호전달 체계를 밝히는 데 중요한 재료로 사용될 수 있을 것이다.

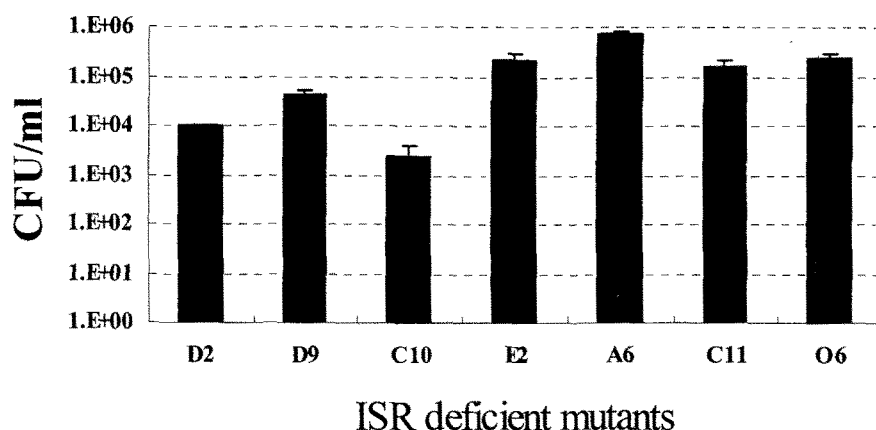


Fig. 8. Growth of *P. chlororaphis* O6 and ISR-deficient mutants in cucumber root exudates. After the bacteria were grown for 48 h in cucumber root exudates, bacterial cell numbers were determined by plating serial dilutions on LB agar plates. The means of three independent experiments were presented, the vertical bars represent the standard errors.

Table 2. Phenotypic analysis of ISR-deficient mutants of *P. chlororaphis* O6

	Phenotypes of O6 derivatives					
	siderophore	protease	HSL	IAA	Biofilm	HCN
O6	10mm	12mm	+	-	+	+
B4( <i>purN</i> )	-	12mm	+	+	+	+
A7(biofilm)	8mm	11mm	+	-	-	+
H10( <i>ttdA</i> )	16mm	12mm	+	-	+	+
A5( <i>secB</i> )	8mm	12mm	+	-	+	+
A7( <i>cheY</i> )	8mm	12mm	+	-	+	+
C10( <i>fum</i> )	8mm	-	-	+	+	-
C2 ( <i>pro</i> )	8mm	-	-	-	+	-
E2( <i>pgpA</i> )	8mm	10mm	+	-	+	+
G12( <i>hlyD</i> )	8mm	11mm	+	-	-	+

### 제 3 절 *Pseudomonas chlororaphis* O6균주의 phenazine 생합성 유전자의 클로닝 및 돌연변이 분석

#### 1. 서언

2절에서 *Pseudomonas chlororaphis* O6균주가 phenazine을 생성하여 식물병원곰팡이인 *Fusarium oxysporium*의 생육을 억제하며 여러 가지 식물병원균에 대해서 병 저항성 유도 능력 (Induced systemic resistance)이 있음을 밝혔다. 생물적 방제균들은 이러한 항균물질들을 생성하여 식물병의 발생을 억제하는 효과가 있을 뿐만 아니라 일부 phloroglucinol이나 siderophore와 같은 항균물질들은 직접 식물병 저항성 유도 능력에 관여하는 물질이라고 알려져 있다 (Lugtenberg et al., 1991; Dunne et al., 1996; Keel and Defago, 1997; O'Sullivan and O'Gara, 1992; Thomashow and Weller, 1995), and induced systemic resistance (ISR) in the host plant (van Peer et al. 1991; Leeman et al. 1995a; Pieterse et al. 1996). 이와 더불어 일부 ISR 유도 균주의 lipopolysaccharide도 ISR를 유도하는 microbial determinant로 작용한다는 보고도 있다.

본 절에서는 O6균주가 생산하는 식물병원 곰팡이의 생육을 억제하는 phenazine의 생합성 유전자를 클로닝하고 유전자의 발현 양상을 reverse transcriptase polymerase chain reaction을 통해 밝히고 생합성 유전자의 조절 기작과 phenazine의 ISR 유도나 식물병원성 곰팡이의 생육 억제에 관여하는지를 밝히기 위해 phenazine 생합성 유전자를 marker exchange 돌연변이를 이용하여 knock out시켜 그 기능을 밝히는 것이 주 목적이다.

#### 2. 재료 및 방법

가. Bacterial strains과 생육 조건.

본 절에서 사용된 균주와 plasmid들의 특성과 표현형들은 Table 1에 기술하였다. 세균의 strains들은 Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989) 나 King' medium B (KB) (King et al., 1954) 의 broth나 agar 배지에서 생육시켰다. Broth 배양은 28 °C에서 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 균주는 15% glycerol (v/v)이 첨가된 KB broth상태로 broth -80 °C deep freezer에서 보관

하면서 필요시 배양하여 사용하였다. 배지에 첨가된 항생제와 농도는 다음과 같다 : ampicillin (50  $\mu\text{g/ml}$ ), tetracycline (20  $\mu\text{g/ml}$ ), kanamycin (50  $\mu\text{g/ml}$ ), 그리고 streptomycin (50  $\mu\text{g/ml}$ ).

Table 1. Characteristics of the bacterial strains and plasmids used in this work.

Strains or Plasmids	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Source or reference
<i>P. chlororaphis</i> O6	Wild-type, Phz <sup>+</sup> , Pro <sup>+</sup> , HCN <sup>+</sup> , Sider <sup>+</sup> , Sm <sup>r</sup> , Am <sup>r</sup>	This study
<i>phzI</i> mutant	Phz <sup>-</sup> , <i>phzI</i> ::Km, Sm <sup>r</sup> , Am <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	This study
<i>phzA</i> mutant	Phz <sup>-</sup> , <i>phzA</i> ::Km, Sm <sup>r</sup> , Am <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	This study
<i>Chromobacte</i> <i>violacearum</i> CV026	Mini-Tn5 mutant, HSL <sup>+</sup> Km <sup>r</sup>	McClellan
<i>Erwinia carotovora</i> SCC1	a bacterial soft rot pathogen	Rantakari et. al.
<i>Fusarium oxysporum</i>	Plant fungal pathogen	J. R. Jarvis
<i>E.coli</i> DH5a	Host strain	BRL Inc. D. R.
pRK2073	helper plasmid, Mob <sup>+</sup> , Tra <sup>+</sup> , Sp <sup>r</sup>	Helinski
pUC19	cloning vector, Am <sup>r</sup>	BRL Inc.
pGEM7Zf	cloning vector, Am <sup>r</sup>	Promega
pCPP54	marker-exchange eviction plasmid, <i>sacB-sacR</i> , Tc <sup>r</sup>	D. Bauer
pRL648	pRL vector containing 1-kb Km <sup>r</sup> cassette	C. P. Wolk
pOphzI	a cosmid clone containing whole <i>phz</i> cluster	This study
pOEEphz	pUC19 with 4.3 kb <i>EcoRI</i> <i>phzI</i> , <i>phzR</i> and <i>phzA</i> fragment	This study
pOSXphzA	pUC19 with 5.7 kb <i>Xma</i> I+ <i>Sal</i> I <i>phzI</i> , <i>phzR</i> and <i>phzABC</i> fragment	This study
pOHKphzA	pUC19 with 4.5 kb <i>Hind</i> III+ <i>Kpn</i> I <i>phzI</i> , <i>phzR</i> and <i>phzABC</i> fragment <i>Bam</i> HI restriction enzyme site containing in <i>phzA</i> gene	This study

<sup>a</sup>Abbreviations : Phz, phenazine; Pro, protease; HCN, hydrogen cyanide; Sider, siderophore; Sm<sup>r</sup>, streptomycin resistance; Am<sup>r</sup>, ampicillin resistance; Km<sup>r</sup>, kanamycin resistance; Sp<sup>r</sup>, spectinomycin resistance; Tc<sup>r</sup>, tetracycline resistance; Mob<sup>+</sup>, mobilizing plasmid; *sacB-sacR*, levan sucrose synthase

#### 나. *P. chlororaphis* O6의 *phz* operon 클로닝

이미 *P. chlororaphis* PCL1391에서 *phz* operon의 structural 유전자들이 클로닝되어 있어서 *P. chlororaphis* O6의 *phz* 유전자를 클로닝하기 위해 partial *phzI*와 *phzA* 유전자 부위를 증폭하기 위해 PCL1391의 sequence를 기초로 primer들을 제작하였다 (*phzI*-Forward: 5'-GYT TTC GGC AYG AAC ART TC-3', *phzI* -Reverse: 5'-CCC AGK CGT TCG TAS TKG AC-3', *phzAB*-Forward: 5'-CAT GAA CSY STT YSA RCA AYT-3', *phzAB*-Reverse: 5'-CGA CCC AGA DRT GRT TVG GRT C-3'). 조제한 primer들을 이용하여 *P. chlororaphis* O6의 genomic DNA를 template로 PCR를 수행하여 384 bp의 *phzI*와 395 bp의 *phzAB* PCR product를 얻은 후 sequencing하여 partial PCR product가 *phzI*와 *phzA*와 유전자 단편임을 확인한 후, cosmid vector인 pCPP46를 이용하여 이미 조제된 *P. chlororaphis* O6의 genomic library (Spenscer et al. 2003)를 screening 하는 데 probe로 이용하였다. 본 절에서 사용했던 *phzI*와 *phzAB* probe와 hybridize된 한 개의 cosmid clone (pOphzI-1)을 선발하였고, subcloning하여 *phz* operon의 sequence를 분석하였다. 염기서열 분석은 전남대학교의 기초과학연구분소에서 수행하였다.

#### 다. DNA 조작.

일반적인 DNA 조작방법은 Ausubel 등 (1989)과 Sambrook 등 (1989)의 방법에 준하여 수행하였다. 제한효소와 modifying 효소의 사용 방법은 제조사의 사용방법에 준하여 실시하였다. Agarose gel에서의 DNA fragments Zymoclean gel DNA recovery kit (Zymo Research Inc., Orange, CA)을 이용하여 분리 정제하였다. Southern 혹은 colony hybridization은 non-radioactive Genius system (Roche Biochem. Inc. Indianapolis, IN)을 사용하여 실시하였다. 다른 genomic이나 plasmid DNA 분리, 및 DNA sequence analysis 등은 본 실험실에서 발표된 기 논문에 준하여 실시하였다 (Kim et al., 1999). Nucleotide 와 deduced amino acid sequences는 University of Wisconsin Genetic Computer Group (GCG) packages와 NCBI Blast program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 그리고 Expasy (<http://www.expasy.hcuge.ch/>) 등의 방법을 이용하여 분석하였다. *P. chlororaphis* O6와 다른 미생물로부터의 *phzI*와 *phz* 유전자와 phylogenetic relationship은 CLUSTAL-W program,

WORKBENCH (<http://www.ch.embnet.org>)을 이용하여 수행하였다. Deduced *phzI*와 *phzA* sequences의 alignment는 BCM Search Launcher의 Multiple Sequence Alignments를 이용하여 수행하였다 (<http://www.searchlauncher.bcm.tmc.edu/>).

라. Real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 *phzI*와 *phzA* 유전자의 발현 분석

다양한 조건에서 생육시킨 *P. chlororaphis* O6 strain들의 total RNA는 Trizol™ (GIBCO BRL, Rockville, MD, USA)을 이용하여 회사에서 제공한 방법에 의해 분리하였다. 분리된 total RNA를 이용한 RT-PCR은 QuantiTect SYBR Green reverse transcription-PCR kit (Quiagen Cat. No. 204243)을 이용하여 수행하였다. RT-PCR를 수행하기 위해 사용된 *phzI* primer로서, forward (5'-CAC ACT GAG CGA AAT GGA C-3'), reverse (5'-CCA TTC ACA AAC TGC CTG-3')를 사용하였고, *phzA* primer로서는 forward (5'-CCT AGC GGC TTT AAT GAT C-3') 와 reverse (5'-GCC ATC CTG AGT GAA CAG-3')를 조제하여 반응액에 첨가하였다. Internal standard로 사용된 16S rRNA 유전자의 primer로서 forward (5'-TGG CTC AGA ACG AAC CCT GGC GGC-3')와 reverse (5'-CCC ACT GCC TCC CGT AAG GA-3')로 사용하였다. 25  $\mu$ l 반응액을 50 °C에서 30 분동안 방치하여 역전사를 시킨 후, PCR을 수행하였다. Rotor-Gene 2000 Real Time Cycler machine을 이용하여 다음의 프로그램을 이용하여 PCR을 수행하였다. 35 cycles denaturation 94 °C에서 15초, annealing 55 °C에서 30초, and extension 72 °C에서 2분동안 실시하였다. Corbett Research Inc., Australia,에서 만든 software를 이용하여 PCR 산물을 분석하는데 사용하였다.

마. Acyl homoserine lactone (AHL) 추출 및 autoinducer bioassay

Wild-type, *phzI* mutant, 그리고 *phzI* complemented mutant를 50 ml LB broth 배지에서 stationary-phase까지 생육시킨 후, AHLs를 추출하였다. 세균은 15,000 × g에서 20분 동안 원심분리하여 제거한 다음, 각 균주의 cell-free 배양 상등액에 동량의 ethyl acetate를 첨가하여 추출하였다. Organic fractions를 모아서 fume hood에서 건조시키고 ethyl acetate에 녹여 사용하였다.



AHLs의 조성을 알아보기 위해서 TLC (C18-reverse phase thin-layer chromatography) 분석을 Shaw 등의 방법 (1997)에 의해 수행하였다. 분리된 ethyl acetate에 녹아있는 AHL들은 C18 reversed-phase silica plates (Aldric Inc. Milwaukee, USA)에서 methanol/water (60:40, v/v)을 용매로 분리시킨 후, 전개된 TLC plates에 24시간 키운 *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClellan et al. 1997)을 0.7% LB agar가 되게 희석하여 도말하였다. 도말된 TLC plate들을 28 °C에서 overnight 배양하면 노란색 background에 purple spots으로 보이는 것을 AHL로 동정하였다.

바. *P. chlororaphis* O6 균주의 *phzI*와 *phzA* mutants 조제.

PhzI 돌연변이주를 조제하기 위해 *phzI* open reading frame (ORF)의 unique *MfeI* site에 kanamycin 저항성 유전자를 가진 1 kb *EcoRI* fragment 인 plasmid pRL648 (Elhai and Wolk, 1988)로부터 분리하여 삽입하여 marker exchange 돌연변이를 하는데 사용하였다. PhzA 돌연변이주는 *phzA* 유전자의 OFR의 *BamHI* site에 kanamycin 저항성 유전자를 지닌 1 kb *BamHI* fragment을 plasmid pRL648로부터 분리하여 *phzA* ORF에 삽입하여 marker exchange 돌연변이를 조제하는데 사용하였다. Kanamycin marker 유전자를 ORF에 삽입하여 돌연변이시킨 *phzI*와 *phzA* 유전자를 *P. chlororaphis* O6 chromosomal *phzI*와 *phzA* 유전자와 교체함으로써 돌연변이를 유지하는데 exchange vector pCPP54 ( $Tc^R$ )를 이용하여 수행하였다. Putative mutants들은 kanamycin 저항성과 5% sucrose첨가된 배지에서 tetracycline에 감수성인 콜로니를 돌연변이주로 간주하여 genomic DNA를 putative mutant들로부터 분리하여 dig-labeled *phzI*와 *phzA*를 probe로 southern hybridization에 의한 확인하여 최종적으로 돌연변이주들을 선별하였다.

사. 유도 전신 저항성(Induced systemic resistance) bioassay

담배 (cv. Xanthi) 종자를 3% (w/v) sodium hypochlorite로 표면 살균하고 멸균수로 여러 번 씻어낸 다음 3% sucrose가 첨가된 0.5% (w/v) MS agar 1 ml를 12-well microtiter plate (SPL, Korea)의 한 hole에 각각 분주한 다음, 종자 한 개를 한 hole에 심은 다음 성장상에서 생육시켰다. 접종원은 LB broth 배지에서 OD600nm가 2.0이 되게 생육시킨 다음 원심분리하고 멸균수로 씻어내고 멸균된 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)로 OD600nm가

0.2가 되도록 희석했다. 3주동안 생육시킨 담배의 뿌리에 조제된 세균 현탁액 ( $1 \times 10^8$  cfu/ml) 10  $\mu$ l 씩을 접종하였다. 세균을 처리한 1주일 후에, 담배에 2  $\mu$ l씩의 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SCCI 현탁액을 잎에 접종하였다. 병원균을 접종한 1-2일후에 무름병 증상을 나타낸 잎을 조사하여 무름병 발생양을 조사하였다.

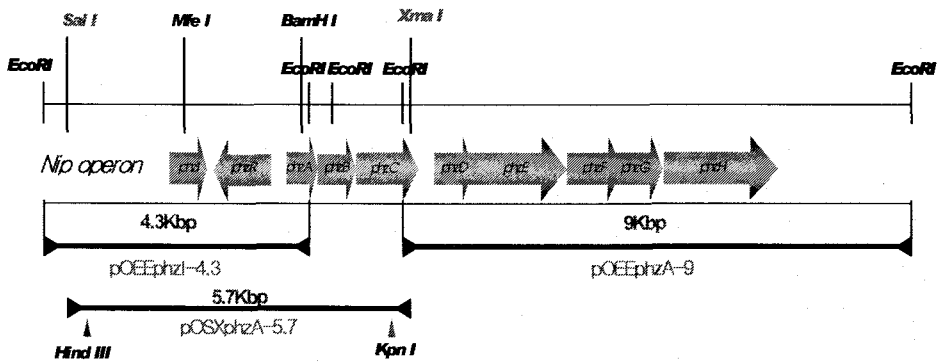


Fig. 1. Restriction maps and locations of individual genes in regions of the *P. chlororaphis* O6 genome containing the *phzI*, *phzR* and *phz* operon

### 3. 결과 및 고찰

가. *P. chlororaphis* O6균주의 *phz* operon 클로닝 및 유전자 분석.

*P. chlororaphis* O6 균주의 phenazine 생합성 유전자를 클로닝하여 분석해 본 결과, phenazine은 8개의 structural genes(*phzA-phzH*)이 관여하여 phenazine이 생합성되며, 이러한 생합성 유전자들의 발현을 조절할 것으로 추정되는 *phzI*와 *phzR*이 phenazine 생합성 구조 유전자의 upstream에 존재함이 밝혀졌다 (Fig. 1)

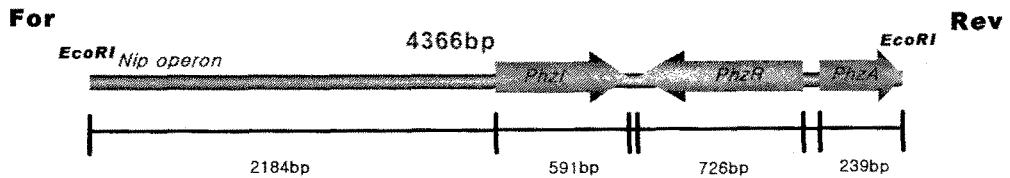
*P. chlororaphis* O6의 *phzI* 유전자는 ORF가 591 bp로서, 196 개의 deduced amino acid로 구성되어 있었고, subunit의 분자량은 약 22 kDa, pI는 6.63이었다 (Fig. 2B). *phzR* 유전자는 ORF가 726 bp로서, 240개의 deduced amino acid sequence로 구성되어 있었고, subunit의 분자량은 27.1 kDa이었고 pI 6.60이었다 (Fig. 2B). *phzA* 유전자는 492 bp ORF, 164개의 deduced amino acid, subunit의 분자량이 18.7 kD, 그리고 pI 6.65 이었다 (Fig. 2D). *phzB* 유전자는 492 bp ORF, 163 deduced amino acid sequence, subunit의 분자량은 18.9 kD 그리고 pI 6.52 이었다 (Fig. 2D).

염기서열 분석 결과 *phzI* 유전자는 *phzR* 유전자로부터 31 bp downstream에 terminator 염기서열이 위치하였다 (Fig. 2A). *phzI* start codon의 upstream 분석 결과 *E. coli*  $\sigma^{70}$  promoter와 유사한 putative RNA polymerase sigma factor binding site가 존재하였다 (Fig. 2B). 부가적으로, promoter 부위와 중첩된 부위에 *lux* box consensus sequence 20개 중에 17개가 일치하는 20 bp palindromic sequence가 존재하였다 (Fuqua et al. 1994). *phzI* 유전자의 operator 부위에 *lux* box-like element가 존재한다는 것은 *phzI* 유전자의 발현이 *N*-acyl-HSL responsive transcriptional activator에 의해 조절된다는 것을 의미한다 (Gray et al. 1994). PhzI deduced amino acid sequence는 *Vibrio fischeri* ATCC 7744의 LuxI 단백질과 49% 상동성을 나타내었고 (Devine et al., 1988) 다른 LuxI family와도 상동성을 나타내 PhzI 단백질은 *P. chlororaphis* O6에서 acyl homoserine lactone (AHL) signal molecule을 만드는데 관여하는 것을 추정된다.

*P. chlororaphis*, *P. aureofaciens*와 *P. fluorescens*의 *phzA* 유전자의 promoter 부위에 한 개의 conserved 18 bp palindromic sequence가 염기서열 분석 결과 발견되었다 (Fig. 3). 이와 비슷한 염기서열이 4개 종의 *phzI* 유전자의 promoter에서도 발견되었다 (Fig. 3). 지금까지의 *V. fischeri*에서의 연

구에 의하면 한 개의 20 bp palindromic sequence는 LuxR 조절 단백질의 binding site로 작용한다고 알려져 있다. 따라서 *P. chlororaphis* O6에서 발견된 유사한 palindromic sequence도 PhzR 조절 단백질의 binding site로 작용하며, *phzR*이 *phzI*의 promoter에 결합하여 *phzI*유전자를 활성화시켜 AHL을 합성한 후, PhzR-AHL의 결합체가 *phzI*와 *phzA*유전자의 발현을 증폭시킴으로 인해 *phz* operon이 활성화되는 것으로 사료된다 (Thomas et al., 2001).

A.



B.

```

gagtgfaaacgacggccagtgattcttctcctggcctggaggacgccgaaggtccgcctcgaaa
tacgcctcgaccagttgctggcgattaccocgctggatgccaaagcgcagcttcggccgca
tcgtcctggccgggcaaacactgctc-----
----- (nif operon 1835bp) -----
gcattctctgagactgcttggggccagactattgccttcaatgccgacgggtggatcaatg
ccoctgtcgcgcgcctgctctcgacaaagcccccaacgaatggcttgcactcgactcca
ccgaagccctaccagatcttgcaggtgccagccctgtgcaagtctcctgcaactgca
Phz box -35 -10
R-B-S
ctccatccctccgcaatgcacatggaagagcacacactgagcgaatggac
PhzI M H M E E H T L S E M D
gatgagctgaaactcatgctggccgctttcggcagcaacaattcgtcgagaaactcgga
D E L K L M L G R F R H E Q F V E K L G
tggcggctgaccagccatccgagccagggcaggttgtgaatgggatcaatcgcacaccgaa
W R L P A H P S Q A G C E W D Q Y D T E
cagcccgctaccctcctggcgttcaatgcagaccgcgccatcgttggctgcgccggctg
H A R Y L L A F N A D R A I V G C A R L
attccaccacgctccccaacctgcttgaaggggtgtcagccatgccctgcgccggggcc
I P T T L P N L L E G V F S H A C A G A
MfeI
ccgccaagcatccagccatctgggaaatgactcgttcaccacctgcgaaccgcaattg
P P K H P A I W E M T R F T T C E P Q L
gcgatgccgttgttctggagaagcctcaagacggccgcccctggcggggcgcagaggccatc
A M P L F W R S L K T A A L A G A E A I
gtgggatcgtcaacagcaccatggagcgtattacaaaatcaacggcgtccactacgaa
V G I V N S T M E R Y Y K I N G V H Y E
cggctgggcccggctcaggtgcaccagaatgagaaaatcctcgcacatcaaacctctcgcc
R L G P V T V H Q N E K I L A I K L S A
caccgagcaccaccgcagcggctgcaccgtcagccttcagtcgggcacattattg
H R E H H R S A V A P S A F M S G T L L
aaagagacagcttgatcacggcccagtcgtcct
E T A -

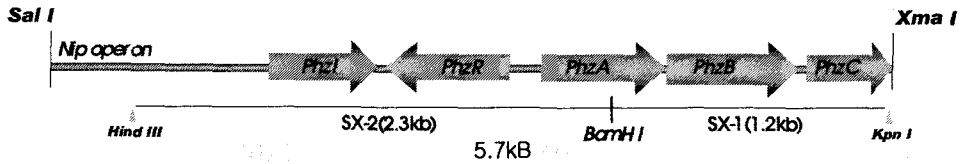
```

ttttgaatgcccctcagatatagcck

- I Y

gcatcgcgactgcgtaagacactgcctgcacgggttactggcgccgattttgcgctggat  
M A V A Y S V A Q V R N S A G I K R Q I  
gttgcggatgatggtaattcacggatcgggtgcacacccccatgatcagccgatttctc  
N R H H Y N V T D T C V G M I V G I E E  
cgaggcttggcgtcggccgtccagccgagcacatcacattccctcccaactgaactccac  
S T K G D A T W R L V D C E R G S F E V  
gcccgattgaagacacgcacgtcgtctccagctcggaaattttctcgtgggcccggc  
G T N F V R V D S E L E S I K E H A A A  
ggcaaaggctctggtcaccggcttcaaaggcttcaaattctgaaggctgatggggttatt  
A F A R T V P K L A E F E Q L S I P N N  
cttggcggccaggcttaacaccccagccctccctgggcttgaacgagggttggccag  
K R A L S L V G V R G Q A N F S P Q A L  
gccgtggcataaattggaatccttggcttcagaccacagggtccggcgcacccccggaacaa  
G H C L H S D K A E S W L D A C G R F L  
ctcattgctccatagaatggggccgacgagactttgctgtgcttaccggtgggatcgt  
E N S W L I P A S S V K S H K V T P D I  
caccgctgattagccgctgatatcgtcgcaccagctcctcgggtaattgccgtacat  
V A Y N A A Q Y R Q V W D E P Y N G Y M  
ataagtcctggccgcgatgaacggggtcacgctgcacatgccgtaggcaaaaaatcaaa  
Y T R P R M F P T V S C M G Y A F F D F  
ccgtagttcggcgaaggccctcaacgcgacagccgtaaaactcctgcataatccatggttcg  
R L E R L A R L A V A T F E Q M D M T R  
cgcaaaagatactataaaagtacgcacatcccatcccaactgctgcctaatccatttgagca  
A F I S Y F Y A D W G L Q Q G L E M *PhzR*  
ccactaaagttgaaacaggccgtagactagaccaacctgaatctctgtcaacaagcaaaa  
tcacatcgtcatagaaggcttggcgtagcactagattcattgtgcctaatccaaccaac

C.



D.

taactagaacattgcatccggogagtttagtaagccattaccaacctttagcggagcga  
tgaacctgaccttccacaataatgcaacagttcattcgggtgggtgcagccaaccggttc  
*Phz box*  
ataccgctaateactacaagatctggtagttccacccccagaacggcaggtgtataaaca  
acacccgctcagcaccggcaccgaggaacatagttaaacactgtataatattcaccacgt  
caattaactaaatatttactttcaacattatcaccocccaactaaggaggatgctgcccatg  
*PhzA M*  
cctgcttgcctttccoctagcggctttaatgatcatcttgaacttgcgcagaaaaatcgc  
P A S L S P S G F N D H L E L R Q K N R  
gccaccgtcgaaacgtacatgocactaacggcaagatgccttgcgcggcatgaactg  
A T V E Q Y M R T N G K D R L R R H E L  
ttcactcaggatggcagtgccggttccctggaacaccgaaaccggtaaacccctcgtgttc  
F T Q D G S G G S W N T E T G K P L V F  
caggccaccgggaagctggcccccctggggcctatggttggagaagtgtcttccagactgg  
Q G G H A K L A A L G A W L E K C F P D W  
caatggcacaacgtccgggtgtttgaaaccgataaccoccaaccacttctgggtggagagc  
Q W H N R V F E T D N P N H F W V E S  
gacggctcggcgaagactcgtgttccgggttatcccggaaggttattggogaaaaccattac  
D G R G K T L V P G Y P E G Y C E N H Y  
atccattcttccgaactggatgacggcaagatcaccgagagccgtgaattcattgaacccc  
I H S F E L D D G K I T Q S R E F M N P  
ttcgaacaactcggccttgggtatcccccgttccaagaatcaagcgtgaaggtatcccc  
F E Q L R A L G I P V P R I K R E G I P  
gcctcataagcccccttaattcattggagattggagccttaacagtgcaaccgcaacaa  
A S - *PhzB M P N S A T Q*  
ctaaccgctaaccgaccactgaacttgcggcgaacacggccaccggctcgagcaatat  
L T A N D T T E L R R K N R A T V E Q Y  
atggcgaccaaaagggcaggccctgcccgcctatgaactatttaccgaagatggtaca  
M R T K G Q D R L R R H E L F T E D G T  
ggcggcttattggaccaccggaacccggcggcggatfgaatacagfggcaagccaagttg  
G G L W T T D T G A P I V I S G K A K L  
ggcgaacatgctgttggctactcaagtgcttccggcactgggaatggtacaacgtcaaaa  
A E H A V W S L K C F P D W E W Y N V K  
gtatttgaaccgatgaccctaaccatattcgggtcagatgcgatggccggcgaagati  
V F E T D D P N H I W V E C D G R G K I  
ctcttccggctatccggaaggctattaccgagaaccacttctcgcactccttccagctg  
L F P G Y P E G Y Y E N H F L H S F E L  
gaagaccgcaaaagttaaaccgcaatcgcgaattcatgaacgtcttccagcaactcggcggc  
E D G K V K R N R E F M N V F Q Q L R A  
ctgggtattccagtcgcaaatcaaacggcgaaggcattccaacttaattccctcgtgaga  
L G I P V P Q I K R E G I P T -  
  
dtgatgcacatggaagacttactgaaacgggttttaagttgtgaagcgttccagcagoc  
*PhzC M E D L L K R V L S C E A F Q Q P*  
caatggagcagccctcacaattgcacgacggcaggccctacctcagggacagccctca  
Q W S E P S Q L H D A Q A Y L R D S A S  
ttgatcaggatggaagacatcctggaagacatcctgggtcctgcccaccgctggtcgt  
L I R V E D I L E D I L V L R A T L A R  
gtagcggccggcgaagcagtggtcactccagtcgggtgactgcccggaggacatggatgaa  
V A A G E A M V I Q S G D C A E D M D E  
agcactcccgaccatgtggccggcaagccgggtgctggacatcctggccggtagcttc  
S T P D H V A R K A A V L D I L A G T F  
cggctggtgaccacgcaaccggtggtacgggtggccggatggccggcagtttgccaag  
R L V T Q Q P V V R V G R I A G Q F A K  
ccggcctccaacaacaacgaaacgcatcggcgatgtcgaattgccgggtgtatccggggac  
P R S N N N E R I G D V E L P V Y R G D  
atggtcaacggccggcaggccgtctgcggtcactgccagcagcagatggcgaacccctggtt  
M V N G R E A V C G H R Q H D A Q R L V  
cgaggctatagcggccgacgggacatcatgcaacacctgggctggaaagcgtcggcaagc  
R G Y S A A R D I M Q H L G W K A S A S  
caggaacaactcagcggttaccggccctggaccagccacgaaatgctggtactcagactc  
Q E Q L S G S P A W T S H E M L V L D Y  
gaactgccacaactcggccagcgaacaggggcccgggtatttctcgggttgcaccactg  
E L P Q L R Q D E Q G P G I S R F D P L  
gccctggatcggcagcgtaccgcctcagttaccggggcctcactgacgtcgtcagcga  
A V D R R A Y P S V N G R S R D A A Q R  
agtgtcaattccgggtggcgtgcaaggttggncccggacatcaccocggaccagttgtg  
S A Q S R R W R A R L X P D I T X D Q L L  
agcgtgtgtgaannccctgga  
S X C E X L

E.

PCL1391 1 MHMEHTLNQMSDELKLMGRFRHEQFVEKLGWRLPAHPSQAGCEWDQYDTEHARYLLAF  
 30-84 1 MHMEHTLNQMSDELKLMGRFRHEQFVEKLGWRLPAHPSQAGCEWDQYDTEHARYLLAF  
 06 1 MHMEHTLSEMDDELKLMGRFRHEQFVEKLGWRLPAHPSQAGCEWDQYDTEHARYLLAF  
 NRRL 1 MHMEHTLSEMDDELKLMGRFRHEQFVEKLGWRLPAHPSQAGCEWDQYDTEHARYLLAF  
 PA01 1 -----

PCL1391 61 NEDCAIVG CARLIPTTFPNLLEGVFGHTCAGAPPKHPAIWEMTRFTT---REPQLAMPLF  
 30-84 61 NEDRAIVG CARLIPTTFPNLLEGVFGHTCAGAPPKHPAIWEMTRFTT---REPQLAMPLF  
 06 61 NADRAIVG CARLIPTTFPNLLEGVFSHACAGAPPKHPAIWEMTRFTT---REPQLAMPLF  
 NRRL 61 NEDRAIVG CARLIPTTFPNLLEGVFSHACAGAPPKHPAIWEMTRFTT---REPQLAMPLF  
 PA01 1 MSRQGLCGCARLIPTTDAYLLKDVAYLCSSETPPSDPSVWELSRYAASAADDPQLAMKTF

PCL1391 118 WRSLKTASLAGADAIVGIVNSTMERYKINGVHYERLGPVTVHONKILAIKLSAHREH-  
 30-84 118 WRSLKTASLAGADAIVGIVNSTMERYKINGVHYERLGPVTVHONKILAIKLSAHREH-  
 06 118 WRSLKTASLAGADAIVGIVNSTMERYKINGVHYERLGPVTVHONKILAIKLSAHREH-  
 NRRL 118 WRSLKTASLAGADAIVGIVNSTMERYKINGVHYERLGPVTVHONKILAIKLSAHREH-  
 PA01 61 WSSLQCAWYLGASSVAVTTTAMERYFVRNGVILQRLGPPQVKVGETLVAISFPAYQERG

PCL1391 177 -HRGAAAPSAFMSDTLLKETA  
 30-84 177 -HRSAVAPSAFMSDTLLKETA  
 06 177 -HRSAVAPSAFMSGTLLKETA  
 NRRL 177 -HRGARLPSGFTSEALLEETA  
 PA01 121 LEMLLRYHPWELQGVPLSMVA

F.

06 1 MPASLSPSGFNDHLELRQKNRATVEQYMRTNGKDRLRRHELFTQDGSGGSWNTETGKPLV  
 30-84 1 MPASLSPSGFNDHLELRQKNRATVEQYMRTNGKDRLRRHELFTQDGSGGSWNTETGKPLV  
 PCL1391 1 MPASLSPSGFNDHLELRQKNRATVEQYMRTNGKDRLRRHELFTQDGSGGSWNTETGEPLV  
 NRRL 1 MPASLSPSGFNDHLELRQKNRATVEQYMRTNGEDRLRRHELFTQDGSGGSWNTETGEPLV  
 PA01 1 MREYQRLKCFDNLLELRQKNRATVEHYMRMKAERLQRHSLFVEDGCAGNWTETSGEPLV

06 61 FQGHAKLAALGAWLEKCFPDWQWHNVRVPETDNPNHFWVESDGRGKTLVPGYPEGYCENH  
 30-84 61 FKGHTKLAALGVWLEKCFPDWQWHNVRVPETDNPNHFWVESERGRKTLVPGYPEGYCENH  
 PCL1391 61 FKGHAKLAALGAWLEKCFPDWQWHNVRVPETDNPNHFWVESDGRGKTLVPGYPEGYCENH  
 NRRL 61 FKGHAKLAALGVWLHQCFPDWQWHNVRVPETDNPNHFWVESDGRGTRVPGYPEGYCENH  
 PA01 61 FKGHESLRRLAEWLEKCFPDWQWHNVRVPETDNPNHFWVESDGRGKALVPGYPEGYCENH

06 121 YIHSFELDDGKITQSRREFMNPFEQLRALGIPVPIKREGIPAS  
 30-84 121 YIHSFELDDGKITQSRREFMNPFEQLRALGIPVPIKREGIPAS  
 PCL1391 121 YIHSFELDDGKITQNRREFMNPFEQLRALGIPVPIKREGIPAS  
 NRRL 121 YIHSFELDDGKITQNRREFMNPFEQLRALGIPVPIKREGIPAS  
 PA01 121 YIHSFELDDGKITQNRREFMNPFEQLRALGIPVPIKREGIPT-

Fig. 2. Map of *P. chlororaphis* O6 *phzI* and *phzA* (A) Restriction enzyme of genomic DNA from *P. chlororaphis* O6 in plasmid pOEEphzI containing the *phzI* and *phzR* gene. Arrows indicate the open reading frame and orientation of the gene. Relevant restriction sites are indicated. (B) Nucleotide and deduced amino acid sequence of *P. chlororaphis* O6 *phzI* and *phzR* genes. A putative  $\sigma^{70}$  promoter sequence and ribosomal binding site are indicated by dark boxes. The most probable start codon for *phzI* is boxed. A palindrome matching the *lux* box consensus sequence is indicated by the large box.

(C) Restriction enzyme of genomic DNA from *P. chlororaphis* O6 in plasmid pOSXphzA containing the *phzA* gene. Arrows indicate the open reading frame and orientation of the gene. Relevant restriction site are indicated.

(D) Nucleotide and deduced amino acid sequence of *P. chlororaphis* O6 *phzA* and *PhzB* gene.

(E) Alignment of deduced *phzI* sequences with those from various *Pseudomonas* bacteria. Deduced *phzI* amino acid sequences had 93% identity with *P. aureofaciens* 30-84, 91% identity with *P. chlororaphis* PCL1391, and 85% identity with *P. fluorescens* NRRL B-1513 and 41% identity with *P. aeruginosa* PAO1 were retrieved from GenBank and used in alignment with the amino acid sequences from *P. chlororaphis* O6 using ClustalW multi alignment tool.

(F) Alignment of deduced *phzA* sequences with those from various *Pseudomonas* bacteria. Deduced *phzA* amino acid sequences had 96% identity with *P. aureofaciens* 30-84, 95% identity with *P. chlororaphis* PCL1391, and 89% identity with *P. fluorescens* NRRL B-1513 and 69% identity with *P. aeruginosa* PAO1 were retrieved from GenBank and used in alignment with the amino acid sequences from *P. chlororaphis* O6 using ClustalW multi alignment tool.



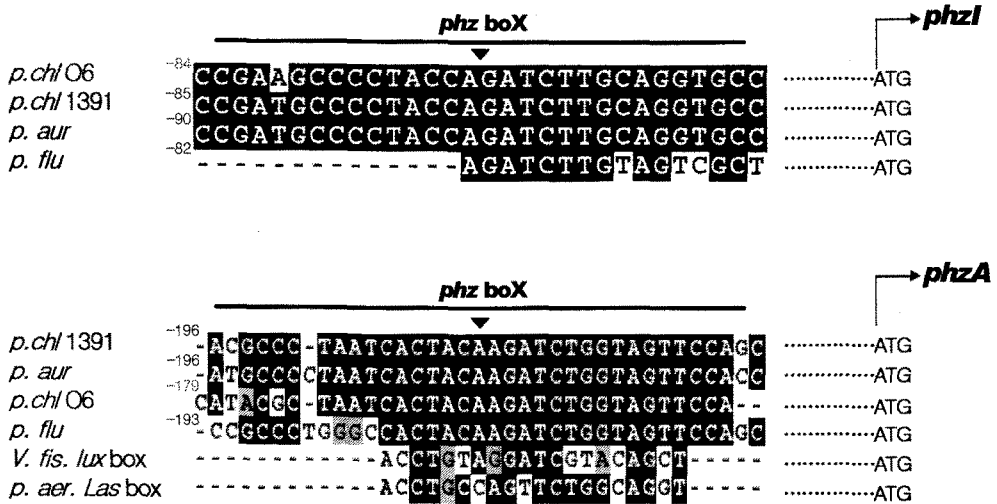


Fig. 3. Homology of gene products regulating phenazine-1-carboxamide (PCN) production in *P. chlororaphis* O6. Identification of palindromic sequences in the *phzI* and *phzA* promoter regions of *P. chlororaphis* O6, *P. chlororaphis* 30-84, and *P. fluorescens* 2-79. The sequences and relative positions of the *phz* boxes and the ATG start codons of *phzI* and *phzA* are indicated.

나. *P. chlororaphis* O6와 GacS 돌연변이주에서의 *phzI*와 *phzA*의 발현 양상 .

다음 절에서 얻어진 결과에 의하면 *P. chlororaphis* O6 균주의 *gacS* mutant phenazines를 전혀 생산하지 못하여, 아마도 *phz* operon은 *gacS* regulator에 의해 조절될 것으로 추정되었다. 이와 더불어 wild-type에서도 phenazine은 주로 세균이 stationary phase에 들어갈 때 생산이 증가한다. 따라서 *phzI*와 *phzA* 유전자의 발현 양상을 wild-type와 *gacS* 돌연변이주의 생육 시기에 따라 조사하였다. *phzI*와 *phzA* 유전자는 예상대로 wild-type에서는 late log phase와 stationary phase에서 관찰되었으나, *gacS* mutant에서는 *phzI*와 *phzA* 유전자의 발현 정도가 모든 생육기에서 크게 감소하였다 (Fig. 4). 이러한 결과는 global regulator *gacS*가 *phzI*와 *phzA* 유전자의 전사를 조절하는 조절자임을 암시하고 있다.

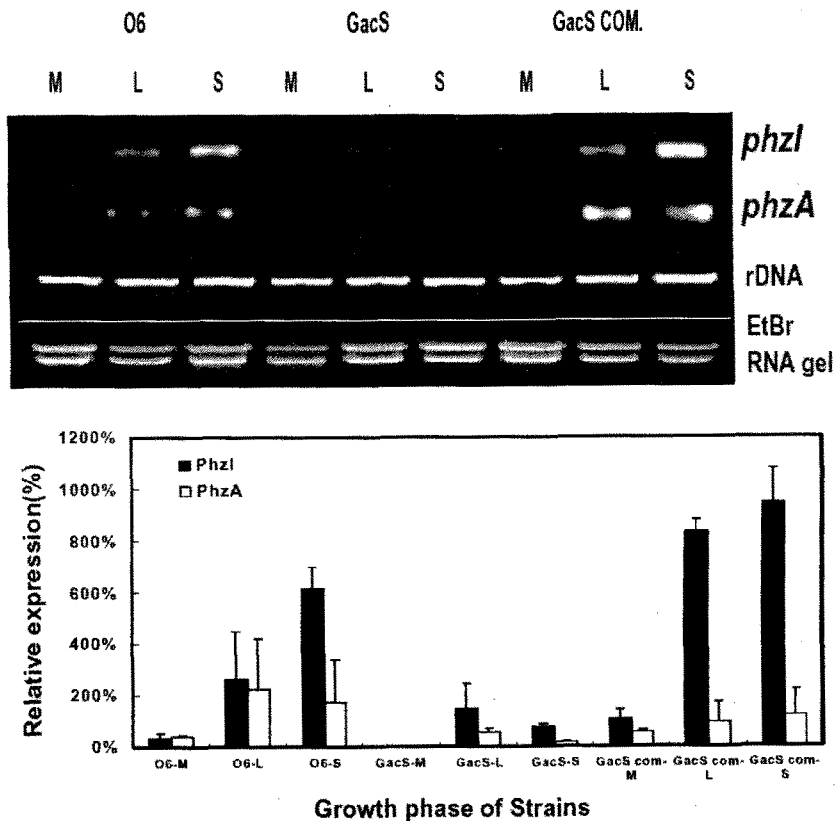


Fig. 4. Differential expression of each gene in wild-type and *gacS* derivatives of *P. chlororaphis* O6 at different growth stages as detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. Bacterial cells were grown in KB broth aerobically at 28 °C with shaking at 200 rpm. At defined growth stages, total RNAs were isolated and used as templates for real time PCR analysis. RT-PCR was performed with specific primer sets for the *phzI*, *phzA* or 16S rRNA genes. RT-PCR reactions were stopped at end of 15th cycle and PCR products were loaded on 1.5% agarose gel. Complete RT-PCR profiles were used to measure relative expression of each gene transcript in wild-type and *gacS* derivative. Relative expression of each transcript for each sample was measured in comparison with each transcript in mid-logarithmic phase of *gacS* mutant as 100%. Data shown are for one of three studies that gave similar results

다. *P. chlororaphis* O6의 PhzI와 PhzA 돌연변이주의 표현형

*P. chlororaphis* O6에서 phenazine의 생성이나 induced systemic resistance 능력에 있어서 *phzI*와 *phzA*의 기능을 알아보기 위해 *phzI*와 *phzA*의 돌연변이주를 조제하였다 (data not shown). *phzI*유전자의 기능이 AHL signal molecule인 AHL을 합성에 관여할 것으로 추정되었던 바, AHL을 wild type, *phzI* 돌연변이주, 그리고 *phzI* complemented 돌연변이주에서 분리하여 TLC 분석에 의해 AHL을 확인하였다. 적어도 3개의 아직까지 동정되지 않은 AHL molecules인 모든 균주에서 확인이 되었으나, *phzI* 돌연변이주에서는 보이지 않은 fast moving 미동정 AHL이 wild type과 *phzI* complemented 돌연변이주에서 관찰되었다 (Fig. 5). 이러한 결과로 미루어 보나 *phzI* 돌연변이주에서 관찰되지 않은 fast moving AHL molecule이 *P. chlororaphis* O6 균주의 phenazine생성에 있어서 중요한 regulator로 작용할 것으로 추정되었다.

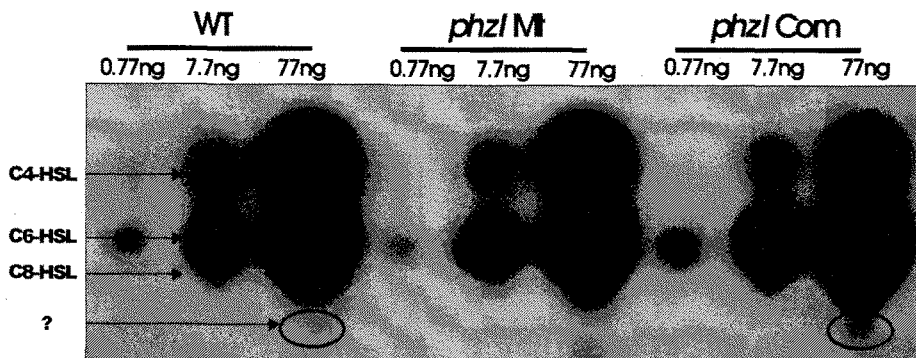


Fig. 5. C18-reverse phase thin-layer chromatography analysis of AHL produced by *Pc* O6 visualized with the *Chromobacterium violaceum* CV026 reporter assay. Lane 1~3 : AHL production by *Pc* O6, Lane 4~6 : AHL production by *phzI* mutant, Lane 7~9 : AHL production by *phzI* complemented mutant.

*phzI* 와 *phzA* 돌연변이주는 어떤 종류의 phenazine도 생산하지 못하였으나, *phzI* complemented 돌연변이주는 wild type level로 phenazine을 생성하였다. 두 돌연변이주에서 phenazine이 생성되지 않은 결과로 식물 병원균인 *F. oxysporum*을 억제하는 능력이 wild type에 비해 현저히 감소하였다. 하지만 다른 protease나 HCN와 같은 생물적 방제에 관련된 이차대사 산물들은 wild type과 비슷한 정도로 *phzI*와 *phzA* 돌연변이주에서 생성되었다

Table 2. Phenotypes of *P. chlororaphis* O6 and *phzI* and *phzA* mutant

Strain	Secondary-metabolite production					Inhibition of <i>F. oxysporum</i>
	Phenazines	Protease (mm)	siderophore	HSL	HCN	
O6	+	8-10	+	++	+	+
<i>phzI</i> Mt. ( <i>phzI::Km</i> )	-	8-10	+	+	+	-
<i>phzA</i> Mt. ( <i>phzA::Km</i> )	-	8-10	-	++	+	-
COM. <i>phzI</i>	+	8-10	++	++	+	+

+ : produce or inhibit, - : did not produce or did not inhibit

++ : over-produce or greatly inhibit

*phzI* 돌연변이가 *P. chlororaphis* O6의 ISR 유도 능력에 영향을 끼치는 지 알아보기 위해, wild type과 *phzI* 돌연변이주, complemented *phzI* 돌연변이주를 담배와 무름병균 (*E. carotobora* SCCI)을 이용하여 조사하였다. *P. chlororaphis* O6 wild type과 complemented *phzI* 돌연변이주를 처리한 담배에서는 물을 처리한 대조구에 비해 무름병균에 의한 병 발생율을 현저히 감소시켰다 (Fig. 6). 그러나 *phzI* 돌연변이주의 ISR activity는 *P. chlororaphis* O6 wild-type과 complemented *phzI* 돌연변이주에 비해 현저히 감소하였다 (Fig. 6). 이러한 결과는 *P. chlororaphis*를 담배의 뿌리에 접종하였을 때 균을 접종하지 않은 잎에 발생하는 병을 방제하는 능력이 보여 induced systemic resistance 능력을 지니고 있었고, *phzI*를 knock out시킨 돌연변이주에서 ISR 유도 능력이 상실된 결과는 아마도 phenazine이 직접적인 ISR 유도 능력에 관여한다기 보다는 아마도 *phzI* 단백질에 의해 만들어진 미동정 AHL에 의해 ISR 유도 능력이 조절되는 것 같다.

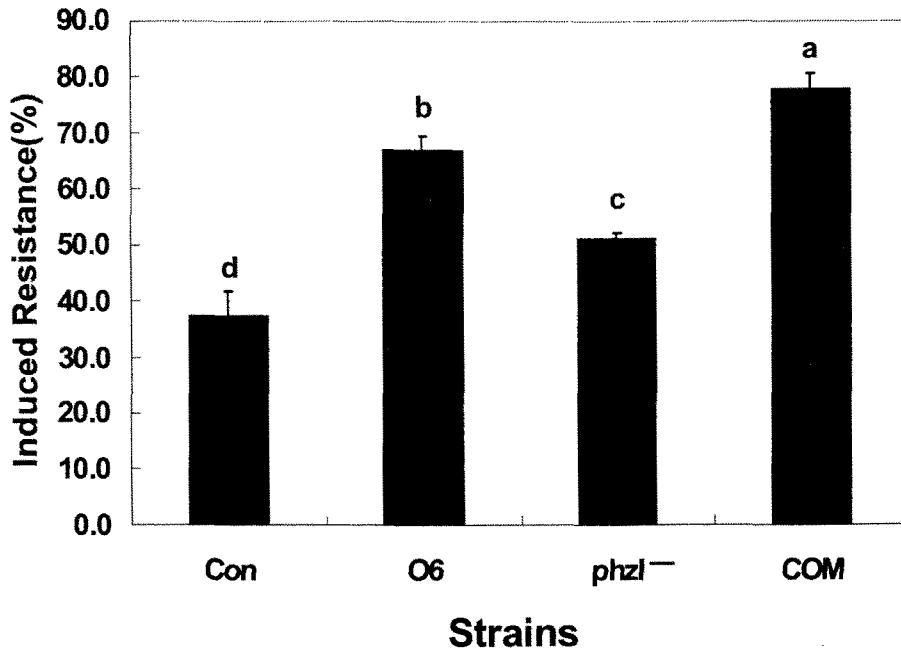


Fig. 6. Induction of disease resistance of *P. chlororaphis* O6 and *phzI* mutant against bacterial soft-rot disease. The number represent means of 66 replication per treatment. The one plant is one replication. *Erwinia carotovora* strain SCC1 were inoculated on 5~6 leaves of two week old tobacco seedling grown in 12 microtiter plates containing 0.5% MS(3 g sucrose per L). Means significantly different compared to control at LSD(P=0.05) and DMRK. In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT. Suspension of *E. carotovora* SCC1 ( $10^8$  colony/ml) was treated on tobacco that plants pre-inoculated *P. chlororaphis* O6 wild-type and *phzI* mutant and *phzI* complemented mutant. After 3 days post-inoculation of the pathogen, numbers and diseases ratio/plant were measured.

*Pseudomonas chlororaphis* O6는 곰팡이의 생육 억제에 관여하는 이차 대사 물질을 생산하며 다양한 식물 병에 대해 유도 전신 저항성의 능력을 가지고 있다. 근권 미생물 *P. chlororaphis* O6의 생물적 방제 활성 능력은 다양한 병원성 곰팡이의 작용을 억제하는 exoenzyme과 extracellular 이차 대사 물질의 생합성에 의존한다. 최근 *P. chlororaphis* O6에서 phenazine의 생산을 조절하는 global sensor kinase인 *gacS* 유전자를 분리하고 성격이 규명되었다. *P. chlororaphis* O6에서 phenazine 생합성을 위해 필요한 *phz* operon의 활성화에 관여하는 신호 전달 경로를 알아내기 위해 *phz* 유전자를 클로닝하고 염기서열을 분석하였다. 분석결과 *phzI/phzR* two component system은 이미 알려진 quorum sensing 조절자인 *luxI/luxR* family와 높은 homology를 보였으며 phenazine 생산은 이 *phzI/phzR* two component system에 의해 조절되어진다.

*phzI* 유전자와 *phzA* 유전자는 late-log phase와 stationary phase에서만 발현하였으며, 각 성장 phase의 *gacS* 유전자 돌연변이에서 *phzI*와 *phzA* 유전자의 발현은 wild-type과 비교하여 감소하였다. *phzI* 유전자와 *phzA* 유전자 돌연변이에서는 phenazine 합성이 이루어지지 않으며 *phzI* 유전자 돌연변이의 병 저항성의 유도는 wild-type과 비교하여 감소함을 보여주었다. *P. chlororaphis* O6에서 *phzI* 유전자는 phenazine 항생물질의 합성과 유도 전신 저항성을 위해 요구되어지는 HSL의 생산에 관여하였다.

## 제 4 절 Induced defence in tobacco by *Pseudomonas chlororaphis* strain O6 involves at least the ethylene pathway

### 1. Introduction

Biological control of plant pathogens by microbes has several bases. The production of antimicrobial compounds that deter growth of the pathogen is one of the mechanisms. Phenazines produced by several plant-associated pseudomonads, *Pseudomonas chlororaphis*, formerly *aureofaciens*, 30-84 (Pierson et al, 1998), *P. fluorescens* 2-79 (Thomashow and Weller, 1988), and *P. chlororaphis* P2E and O6 (Kropp et al, 1996; Radke et al, 1994), inhibit the growth of fungi, including plant pathogens. Field studies indicate that the phenazines are produced when the bacteria colonize plant roots and that they are important in biological control (Thomas, 1998; Thomashow et al, 1990). A second method of control of pathogens is by the induction of plant defenses. Differential expression of defense genes is controlled through two pathways, the salicylic acid (SA) or the jasmonic acid (JA)/ethylene pathway (Delaney et al, 1994; Heil and Bostock, 2002). Enhanced expression from the promoter of the PR-1 gene, associated with the SA pathway, is observed in plants with root colonization by bacilli and pseudomonads (Park and Kloepper, 2000; Zdor and Anderson, 1992). In contrast, the induced systemic resistance (ISR) caused by colonization by a *P. fluorescens* isolate is SA-independent but requires the JA/ethylene pathway (Pieterse et al, 1998)].

We are interested in the interactions between plant roots and the pseudomonad isolate, *P. chlororaphis* O6. The *P. chlororaphis* O6 bacterium appears to be similar to *P. chlororaphis* 30-84 in producing the same phenazines with their characteristic orange pigmentation. The *P. chlororaphis* O6 strain was identified from its fatty acid composition conducted by MIDI Inc., Newark, DE. Because phenazines are redox active, it seemed possible that their production might stimulate resistance in plant tissues (Vera-Estrella et al, 1994). Indeed while we were conducting the

studies reported in this paper, Audenaert et al. published that phenazine-1-carboxylate and a siderophore, pyochelin, produced by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2 both contributed to the ability of this isolate to induce systemic resistance in tomato.

The studies in this paper compare the response of tobacco to the wild-type *P. chlororaphis* O6 strain and a GacS mutant, a mutant lacking production of phenazines but still secreting siderophore. Previous studies with *P. chlororaphis* 30-84 showed that the GacA-GacS two-component sensor-kinase system is a key regulator of such traits as the production of phenazines, extracellular protease and hydrogen cyanide (Chancey et al, 1999; Heeb et al, 2001; Pierson et al, 1998). GacA/GacS systems also regulate the production of antifungal compounds and/or virulence factors in other plant-associated pseudomonads (Corbell and Loper, 1995; Hrabak and Willis, 1992). We examined systemic induction of defense in plants with roots colonized by *P. chlororaphis* O6 or its GacS mutant by determining whether the symptoms of disease caused by two leaf pathogens, *Pseudomonas syringae* and *Erwinia carotovora*, were altered. To probe which pathways of induced resistance were activated, we used transformed tobacco altered in ethylene perception or in the accumulation of SA to determine whether resistance induction by *P. chlororaphis* O6 or the GacS mutant was modified. Also, we assayed the transcript levels of defense genes that were typical of the JA/ethylene or the SA pathways of induced resistance. We find resistance induced by *P. chlororaphis* O6 was not correlated with phenazine formation but was dependent upon GacS when tobacco was challenged with *E. carotovora*.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Bacterial growth medium**

The *P. chlororaphis* O6 strain was stored in 20% glycerol (v/v) at 28 °C. Wild-type *P. chlororaphis* O6 and its derivatives were grown with the following media: potato dextrose (PD, Difco, Detroit, MI, USA), King's medium B (KB) (Difco, Detroit, MI, USA) or minimal medium with glucose



as the carbon source (Kim et al, 1997). Agar was used in these plates at 2% (w/v) and kanamycin (Km) was added at 20 mg ml<sup>-1</sup> when the GacS mutant was grown and Km plus tetracycline (Tc) at 20 mg ml<sup>-1</sup> for growth of the complemented mutants. Broth cultures were shaken at 100 rpm at 28 °C.

## 2.2. Construction of a GacS mutant of *P. chlororaphis* O6

Wild-type *P. chlororaphis* O6 was subjected to Tn-5 mutagenesis using a Tn-Lux cassette constructed by Wolk et al. and kanamycin-resistant isolates were selected that no longer produced the characteristic orange color of the *P. chlororaphis* O6-phenazines when grown on KB plus kanamycin. Restoration of phenazine formation was achieved by transfer to one of the transposon mutants of plasmid, pOKB6.3, a broad host range plasmid pCPP46 (TcR) containing a 6.3 kb *Bam*HI-*Kpn*I fragment from wild-type *P. chlororaphis* O6 bearing the *gacS* gene. GacS mutants were constructed in *P. chlororaphis* O6 by replacement of its wild-type gene with a disrupted *gacS* gene, using a method previously described (Miller et al, 1997). Briefly, the *gacS* gene from *P. chlororaphis* O6 was disrupted by insertion of a 900 bp kanamycin resistance gene, digested with *Eco*RI from pRL648 (Elhai and Wolk, 1988) into the unique *Eco*RI site of the *gacS* ORF between predicted amino acids (aa) 287 and 288. The mutated gene was inserted into the plasmid eviction vector pCPP54 (Miller et al, 1997) and was transferred to *P. chlororaphis* O6 by triparental mating. Marker-exchange mutants were isolated on selective medium and mutation of the *gacS* gene was verified by Southern hybridization using pOKB6.3 as the probe labelled with digoxigenin following manufacture's instructions (Roche, Indianapolis, IN, USA). Complementation of the mutants was achieved using plasmid pOKB6.3.

## 2.3. Characterization of the GacS mutant cells

Isolation and detection of extracellular protease activity involved measurement of the zone of clearing around colonies plated onto medium

containing 2% skim milk and agar after 3 days of incubation at 28 °C (Chancey, 1999). Siderophore production was determined on chromazol-S-plates by measuring the size of the decolorized halo around the inoculation site after 3 days of incubation at 28 °C (Schwyn and Neilands, 1987). Inhibition of the growth of *Rhizoctonia solani*, isolate RE1, a pathogen of sugar beet (Lovic et al, 1993), a carrot pathogen, *Sclerotium rolfsii* and the cause of crown rot of wheat *Fusarium culmorum* (Kropp et al, 1996) was determined by streaking the bacterial isolate on potato dextrose agar plates, 4 cm away from a 1 cm cube plug of agar excised from the growing edge of a culture of the fungus. No bacteria were inoculated in the controls. The growth of the fungus was measured after three days of incubation at 28 °C.

#### 2.4. Induction of plant disease resistance by O6 and GacS mutant: whole plant studies

Transgenic NahG tobacco and its parental line cv. Xanthi-nc were provided by Dr John Ryals, Novartis, Research Triangle Park, NC, USA. Wild-type plants GTX3 were obtained from Dr L-H Zhang, Institute of Molecular Agrobiology, The National University of Singapore, Singapore. Tet18 and its parental line cv. Samsun-NN were obtained from Dr. Huub JM Linthorst, Leiden University, Leiden, Netherlands. Tobacco seeds were surface-disinfested by soaking in 70% ethanol for one to 2 min followed by soaking in 1% sodium hypochlorite for 30 min. Seeds were rinsed in sterile distilled water three times. The sterilized tobacco seeds were placed on MS agar (GIBCO-BRL, Rockville, MD, USA); with the addition of agar 0.8%, and in some studies sucrose to 1.5%), in microtiter plates (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA). Seeds were germinated in growth chambers with a 14 h light period at 25-28 °C and were transferred under sterile conditions to sterilized microtiter plates. Two weeks after transplanting, suspensions containing  $10^{6-7}$  colony forming units (cfu) of *P. chlororaphis* O6 or the GacS mutant were pipetted into the agar to contact the roots. These bacterial cells had been grown for 14 h to stationary-phase in KB medium, pelleted by centrifugation at 10,000g, and

washed once with sterile water. Other treatments were: water as a control, 1 mM salicylic acid (Sigma, St Louis, USA), or 1 mM 1-aminocyclopropane -1-carboxylic acid (ACC) (Sigma, St Louis, USA). Also, as a control for systemic stimulation of the SA pathway of defense, the seedlings were sprayed with a mixture of 1 mM SA. The seedlings were grown for an additional 7-10 days when leaf tissue for Northern analysis was harvested and immediately frozen in liquid nitrogen. Other leaves were ground in sterile water and plated onto KB and KB-Km plates to check for the presence of *P. chlororaphis* O6 and the GacS mutant, respectively. Colonization of the roots by *P. chlororaphis* O6 and the GacS mutant was assessed by transfer of the seedling roots onto KB medium for *P. chlororaphis* O6 growth and KB-Km plates for the growth of the GacS mutant.

To examine for the stimulation of plant defense gene expression, leaves were ground into a powder in liquid nitrogen and stored at -70 °C. The powdered leaf material was extracted for RNA using Tri reagent according to the manufacturer's protocol (MRC, Cincinnati, OH, USA). Northern analysis was performed to determine the abundance of transcripts from plant defense genes by following standard methods (Yang et al, 2002). Total RNA (10 µg lane<sup>-1</sup>) was separated on 1.5% formaldehyde agarose gels and transferred to positively-charged nylon membranes. Membranes were hybridized at 65 °C overnight with digoxigenin labelled RNA probes (Roche, Indianapolis, IN, USA). After high stringent washing at 65 °C, immunological detection of bound probes was performed according to the standard protocol for CDP-Star (Roche, Indianapolis, IN, USA). The genes examined for induction were: PR-1a, encoding a pathogenesis related protein 1a, PR-1g, encoding a pathogenesis related protein 1g, LOX, encoding lipoxygenase, and HMGR, encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (Yang et al, 2001, 2002). PR-1a is associated with the SA pathway of defense, whereas PR-1g, LOX and HMGR are linked with the ethylene and/or jasmonate signaling (Choi et al, 1994; Eyal et al, 1992; Heitz et al, 1997).

To determine whether plants were protected against disease, plants were challenged with a pathogen 1 week after the wild-type or GacS

bacterial inoculation or after chemical treatments. The seedlings were challenged with *E. carotovora* subsp. *carotovora* strain SCC1 or *P. syringae* pv. *tabaci*, applied as 20 ml droplets of suspensions ( $10^{8-9}$  cfu ml<sup>-1</sup>) to the leaves. Disease was assessed after 24 h for *E. carotovora* and 7 days for *P. syringae* pv. *tabaci*. The 0–10 disease scales were established with the following guides: for *P. syringae* pv. *tabaci*: 0, no symptoms; 2, mild yellowing on inoculated leaf; 5, extensive yellowing and brown necrotic lesions; 6–9, intensification of leaf necrosis; 10, whole plant release; for *E. carotovora*: 0, no symptoms; 2, mild yellowing on inoculated leaf; 5, partial softening collapse of leaf at the inoculated site; 6–9, intensification of leaf soft rot; 10, leaves rotted and whole plant collapse. These scales were established using inoculum with increasing cfu m<sup>-1</sup>.

In studies of disease protection in more mature plants, the sterile-grown seedlings were transferred to commercial potting mix (Garden Grow Co., Independence, OR, USA). Three weeks after transfer, plants were inoculated by drenching the potting mix till run off with a suspension ( $10^7$  cfu ml<sup>-1</sup>) of *P. chlororaphis* O6 or GacS mutant cells. After 7 days plants were challenged by infiltration of segments of the leaves with suspensions at  $1 \times 10^6$  and  $1 \times 10^7$  cfu ml<sup>-1</sup>. Plants were grown for further 4–8 days in a growth chamber to allow symptoms to develop. Colonization of the roots by *P. chlororaphis* O6 or by the GacS mutant was checked by transfer of about 3 cm lengths of the intact root, including the root tip, to KB or KB-Km medium. Growth of colonies was assessed visually after 4 days of incubation at 28 °C. Colonization of the leaves was examined by grinding 1 cm discs of leaf tissue in sterile water and plating onto KB or KB-rif (25 mg ml<sup>-1</sup>) medium.

## 2.5. Suspension-cultured cell studies

*N. tabacum* L. cv. *Xanthi* tobacco suspension cells were cultured in the dark at 25 °C in MS medium supplemented with 1 mg l<sup>-1</sup> a-naphthaleneacetic acid, 0.1 mg l<sup>-1</sup> benzyladenine and 3% (w/v) sucrose. Cells were subcultured weekly and used 4 days after subculture. The plant cell suspensions were inoculated with  $10^7$  cfu 50 ml<sup>-1</sup> of *P. chlororaphis* O6

or GacS mutant cells that had been grown to stationary-phase in KB, pelleted by centrifugation and washed once with water prior to resuspension in water and immediate use. Controls were treated with equal volumes of sterile water. At the time prior to inoculation, and after 24 h, plant cells were harvested, RNA extracted and Northern analysis performed as described for the leaf tissues.

### 3. Results

#### 3.1. Cloning of the *gacS* gene

Plasmid pOKB6.3, containing a 6.3 kb *Bam*HI-*Kpn*I fragment from *P. chlororaphis* O6, restored the ability of an uncharacterized Tn5 mutant of *P. chlororaphis* O6 to produce phenazines. This fragment contained the *gacS* gene from *P. chlororaphis* O6 which had a predicted 2754 bp open reading frame (GenBank accession number AF192795) encoding a peptide of 918 amino acids with molecular mass 101 kDa and pI 5.3. The deduced amino acid sequence of the *P. chlororaphis* O6 *gacS* gene had high identity with other GacS kinases from *P. chlororaphis* 30- 84 (97%), *P. fluorescens* (91%), *P. tolassi* (87%), and *P. syringae* pv *syringae* (78%). The predicted GacS protein from *P. chlororaphis* O6 had all the conserved domains found in other sensor kinases, as discussed by Heeb and Haas. Two transmembrane domains existed in the N terminal region and a conserved histidine residue, corresponding to the H-box, was located at amino acid 294. Two linker domains, proposed to be involved in the process of kinase activation were present. The conserved aspartate-aspartate (DD), the aspartate (D), and the lysine (K) residues of characteristics of receiver domains were found in the C terminal regions of the deduced GacS amino acid sequence.

#### 3.2. Characterization of GacS mutants of *P. chlororaphis* O6

Four GacS mutants of *P. chlororaphis* O6, M1-M4, were derived by insertion of a kanamycin-resistance gene at the *Eco*RI site within the

*gacS* gene of wild-type *P. chlororaphis* O6. Although the wild-type when grown on KB medium produced three phenazines, which migrated on thin layer chromatography plates with the same Rf values as those in extracts from *P. chlororaphis* 30-84, no phenazines were detected from the GacS mutants (Table 1). The GacS mutants lacked production of extracellular protease (Table 1). They overproduced siderophore (Table 1). Each GacS mutant lacked the ability to inhibit growth of the pathogenic fungi, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfisii* and *Fusarium culmorum* that was observed with the wild-type strain (data not shown). All of these properties were restored in a stable manner to at least wild-type level by complementation with the wild-type *P. chlororaphis* O6 gene from plasmid pOBK63 (Table 1). Further studies were conducted with mutant M1 and its complemented strain C1.

Table 1. Phenotypes of wild-type, GacS and complemented GacS mutants of O6

Strains <sup>a</sup>	Production of secondary metabolites		Production of siderophore (mm) <sup>b</sup>
	Phenazines <sup>c</sup>	Protease(mm) <sup>d</sup>	
O6	+	7-8	4-5
M1-M4	-	0	7-8
C1-C4	+	7-8	5-6

<sup>a</sup> Each study was repeated at least three times with the wild-type *P. chlororaphis* O6, the GacS mutants, M1-M4, and the complemented GacS mutants, C1-C4 strains.

<sup>b</sup> Siderophore was assessed on chromazol-S plates by measuring the size of the decolorized halo in mm around the inoculation site after 3 days of incubation at 28 °C.

<sup>c</sup> The three phenazines were detected by TLC analysis and by spectrophotometric analysis for peak absorbance wavelength.

<sup>d</sup> Protease activity was detected on skim milk agar plates and denoted as the zones of clearing in millimeters.

### 3.3. Colonization of tobacco roots and induction of defense mechanisms

*P. chlororaphis* O6 aggressively colonized roots of tobacco seedlings under sterile and non-sterile conditions in potting mixes containing a mixture of other bacteria (detected at  $2.3\text{--}7.1 \times 10^6$  cfu g<sup>-1</sup> matrix) and fungi, including a parasitic *Trichoderma* species. Characteristic orange colonies of *P. chlororaphis* O6 were detected growing from the roots when these were placed onto KB medium. Fluorescent kanamycin-resistant colonies of the GacS mutant were recovered from the plants inoculated with the GacS mutant. In other studies, where cell counts were made by dilution plating, GacS cells were recovered at the same level as the wild-type cells (data not shown). Microbial growth from roots grown in non-sterile soils is shown in Fig. 1. The figure shows orange coloration typical of *P. chlororaphis* O6 when rhizosphere soil and roots from *P. chlororaphis* O6-inoculated plants are plated onto KB-rif medium. Roots from plants not inoculated with *P. chlororaphis* O6 do not show this coloration and fungi grew profusely, as shown in Fig. 1. Roots from tobacco grown under sterile and non-sterile conditions 1 or 2 weeks after inoculation with GacS always produced colonies that were fluorescent and rifampin- and kanamycin-resistant when cultured on KB plates (data not shown). Rifampin and kanamycin-resistant fluorescent colonies were not observed from the control roots not inoculated with GacS.

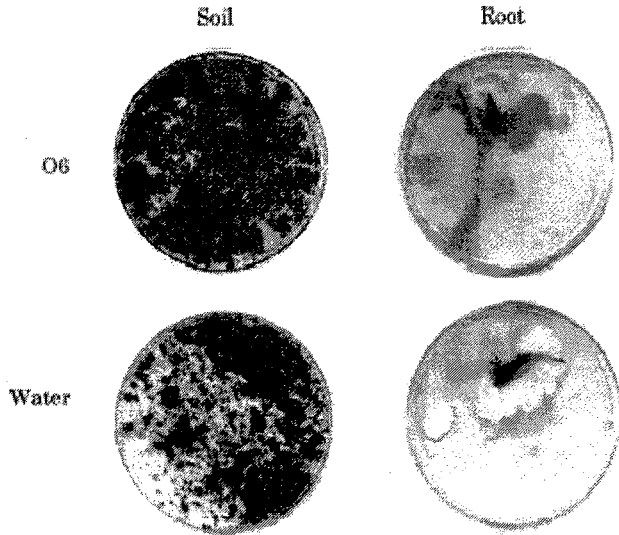


Fig. 1. Aggressive colonization of plant roots in a non-sterile soil by *P. chlororaphis* O6. Tobacco seedlings grown from seed with or without *P. chlororaphis* O6 inoculum for 4 weeks under sterile conditions were transplanted into non-sterile potting soil. After 1 week, roots and adhering soil were transferred to KB medium plates that were incubated at 27 °C for 4 days. Orange-pigmented colonies characteristic of *P. chlororaphis* O6 are present on the soil plate and are associated with the root of the *P. chlororaphis* O6-inoculated plant. Other bacteria and fungi are present in the soil and are associated with the roots of the control plates. Fungi are not visible from the roots of the *P. chlororaphis* O6-colonized root, indicating control of fungal growth. This finding was observed in five different studies.



### 3.4. O6 and the *gacS* mutant induce accumulation of defense gene transcripts

Hybridization of RNA extracts from leaves of plants with roots colonized by *P. chlororaphis* O6, showed increased accumulation of transcripts hybridizing to probes for the tobacco defense genes PR-1g, HMGR and LOX (Fig. 2A). No transcript accumulation was observed with the PR-1a probe, although hybridization was observed in extracts from plants sprayed with salicylic acid (Fig. 2(A)). Also, no increase in GUS activity was observed after *P. chlororaphis* O6 colonization of seedlings of tobacco engineered to express GUS from a PR-1a promoter fusion (data not shown). To verify that the changes in RNA levels were a result of the inoculation of the plants with *P. chlororaphis* O6 and not due to a contaminating organism, we examined the response in tobacco suspension cells. Exposure of suspension-cultured tobacco cells to *P. chlororaphis* O6 induced increased transcript accumulation of PR-1g and HMGR, but neither LOX nor PR-1a (Fig. 2(B)). Root colonization by cells of the GacS mutant likewise caused increased accumulation of the same defense gene transcripts as the wild-type in seedlings. Exposure of the suspension-cultured tobacco cells to cells of the GacS mutant resulted in an increase of transcripts from the PR-1g and HMGR genes (Fig. 2A and 2B).

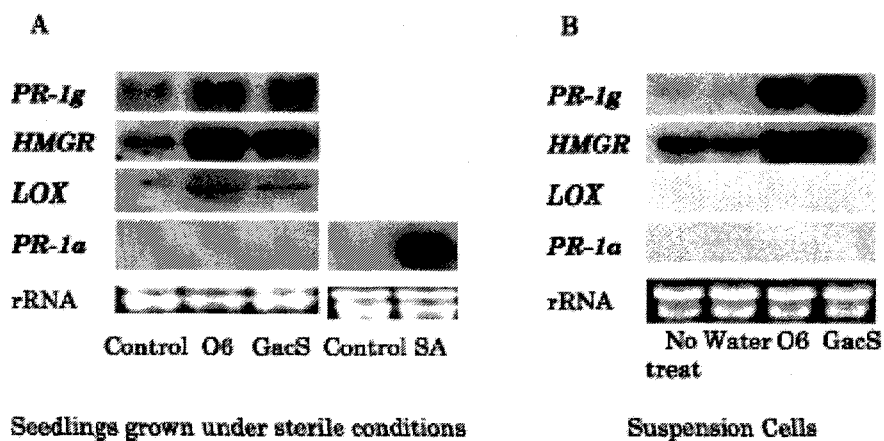


Fig. 2. *P. chlororaphis* O6 and GacS induced accumulation of defense gene transcripts. (A) Seedlings were grown on sterile medium and were harvested at 5 weeks, 1 week after inoculation with *P. chlororaphis* O6 or GacS cells or treatment with water as non-inoculated controls. Other plants were treated for 24 h with 1 mM salicylic acid to induce PR-1a expression. (B) Suspension cultured cells, 3 days after transfer into new medium, were inoculated with *P. chlororaphis* O6 or GacS cells. Other suspensions were treated with water as a control. Plant cells were harvested after 24 h. RNA was prepared from leaf and suspension cells and probed for transcript accumulation for specific genes as described in Materials and Methods.. Data shown are representative of three separate studies.

### 3.5. Induction of systemic resistance by O6 and the *gacS* mutant

Symptom development in seedling tobacco grown in otherwise sterile conditions confirmed that *P. chlororaphis* O6 provided protection against pathogen challenge. The results of challenges of wild-type and transgenic tobacco seedlings with two pathogens, the soft rot pathogen *E. carotovora* subsp. *carotovora* and the wild-fire pathogen *P. syringae* pv. *tabaci* are shown in Table 2. *P. chlororaphis* O6 colonization resulted in protection of the plant to both pathogens in two wild-type tobacco

cultivars, Xanthi-nc, and Samsun-NN. However, the responses to *Erwinia* and the pseudomonad differed for plants colonized by GacS. In the wild-type plants, the GacS mutant protected at the same level as the wild-type against the wild fire pathogen but the GacS mutant was ineffective against the soft rot pathogen.

Table 2. Protection by *P. chlororaphis* O6, GacS and the complemented GacS mutant against disease in tobacco caused by two leaf pathogens

	Disease index: tobacco cultivar			
	Xanthi-nc		Samsun-NN	
	Wild-type	NahG-10	Wild-type	Tetr18
(A) Pathogens: <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>				
control	8,00	8.67	8.11	8.50
O6	4.50*	4.33*	4.33*	7.29
GacS	8.00	5.83*	6.89	8.00
ComplGacS	4.17*	3.67*	4.44*	8.00
ACC	ND	ND	5.50*	8.83
SA	5.50*	8.50	ND	ND
LSD0.05	1.16	2.27	1.85	1.32
(B) Pathogen: <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>				
Control	8.50	7.83	7.67	7.17
O6	2.17*	2.00*	3.67*	1.33*
GacS	2.00*	4.01*	3.68*	2.68*
ComplGacS	2.83*	4.88*	3.00*	1.50*
ACC	ND	ND	4.00*	8.83
SA	2.33*	6.50	ND	ND
LSD0.05	2.02	1.84	1.46	1.54

Data are based on inoculations of four leaves of 12 3-week-old seedlings grown in microtiter plates containing sucrose-amended MS medium. Plants were treated with *P. chlororaphis* O6 and its mutants or with the chemicals SA and ACC 2 weeks after planting. Disease index is based on a scale of 1-10. Asterisk means significantly different from control at LSD (P=0.05).

To initiate understanding of the pathways involved in resistance, we examined the responses in plants treated with SA or ACC and in transformed plants deficient in SA mediated resistance, because of the presence of a NahG gene, and in an ethylene-insensitive line (Table 2). The results suggested to us the involvement of several factors in the induced protection. Applications to wild-type Xanthi of SA and of ACC to Samsun-NN increased resistance to both pathogens. Loss of the SA-pathway in the NahG-tobacco eliminated the protection against both pathogens when SA was applied. However, in the NahG plants colonized by *P. chlororaphis* O6, the GacS mutant or the complemented mutant protection was evident against *P. syringae*. With challenge by *E. carotovora*, some protection was observed in the NahG-plants colonized by the wild-type *P. chlororaphis* O6, the complemented mutant and also the GacS mutant. Loss of the ethylene pathway in the transformed tobacco eliminated induced resistance to the soft rot pathogen by ACC treatments and in the plants colonized by *P. chlororaphis* O6, GacS and the complemented GacS mutant. However, the ethylene-insensitive transformed tobacco was still protected against *P. syringae* challenge when the roots were colonized by wild-type, GacS mutant and complemented strains.

Disease symptoms in potting soil-grown mature plants challenged with the wild-fire pathogen *P. syringae* pv. *tabaci* were reduced in severity by *P. chlororaphis* O6-root colonization. There was strong consistent protection against *P. syringae* when inoculated at  $10^6$  cfu ml<sup>-1</sup> (Fig. 3). There was no protection at the higher inoculum level of  $10^7$  cfu ml<sup>-1</sup>. Rifampicin-resistant, fluorescent cells of the pathogen *P. syringae*, but not the orange-colored cells characteristic of *P. chlororaphis* O6, were recovered from ground extracts of the leaf tissues. No fluorescent bacterial cells were recovered from non-challenged leaves. With plants colonized by GacS, protection against *P. syringae* was variable: protection, as determined by reduction in the leaf symptoms, equivalent to that generated by colonization with the wild-type *P. chlororaphis* O6 was observed in two out of five studies. An example of the lesser level of protection in GacS-colonized plants observed in the other studies is provided in Fig. 3.

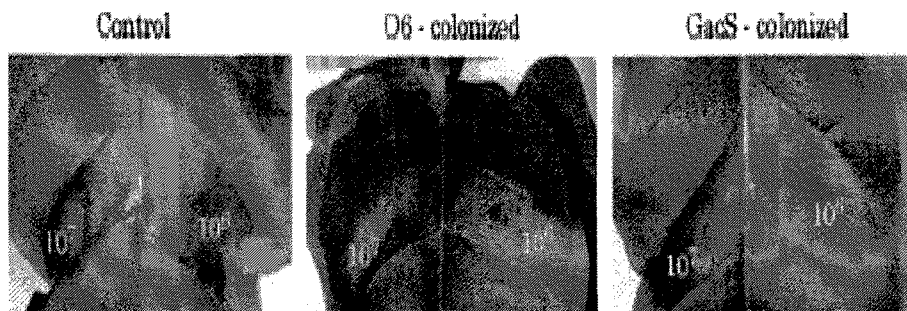


Fig. 3. Reduced symptom formation in mature tobacco leaves 4 days after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Seedlings were grown under sterile conditions for 4 weeks prior to transplant into non-sterile potting soil. Inoculum of *P. chlororaphis* O6 or GacS cells was applied at 7 weeks by drenching the soil. At 8 weeks, leaves were challenged with *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* infiltrated at doses of  $10^6$  or  $10^7$  cfu ml<sup>-1</sup> as indicated. Symptoms were recorded at 4 days after pathogen challenge. The data are from one of five studies where the results of *P. chlororaphis* O6-colonization were consistent. In three out of the five studies, GacS mutant colonization caused no protection. The leaf shown is representative of one of the two studies where symptoms were reduced in GacS mutant-colonized plants. In the other three studies the extent of the symptoms was the same as in control plants not colonized by *P. chlororaphis* O6.

#### 4. Discussion

The GacS protein of the two-component GacA-GacS sensor system regulated the production of phenazines, protease and siderophore by *P. chlororaphis* O6, showing similarity to *P. chlororaphis* 30-84. Like *P. chlororaphis* 30-84 (Chancey et al, 2002), the *gacS* lesion did not prevent root colonization by the bacterium under sterile and the non-sterile laboratory greenhouse conditions that we used. The *P. chlororaphis* O6 wild-type isolate was very aggressive in its colonization being readily culturable from roots even although the potting soil had high counts for other culturable organisms. This aggressive colonization of *P. chlororaphis* O6 under non-sterile conditions with an array of other soil organisms was observed also for bean and wheat (data not shown).

The *P. chlororaphis* O6 wild-type isolate stimulated systemic resistance in tobacco. Resistance to two types of leaf pathogens, a soft rot pathogen and one that caused necrosis through the production of toxins, was observed in seedlings grown under sterile conditions. Protection against the wild fire pathogen was demonstrated also in more mature plants transferred to grow in non-sterile potting soil.

Exposure of suspension-cultured tobacco cells and the seedlings to *P. chlororaphis* O6 and the GacS mutant stimulated accumulation of transcripts of plant defense genes under ethylene and JA regulation, PR-1g (Eyal et al, 1992), and HMGR (Choi, et al, 1994). Although transcripts from LOX (Heitz et al, 1997) increased in the seedlings, this response was not observed in the suspension cells, perhaps because of the lack of developmental factors required for expression of this gene. These findings suggested that *P. chlororaphis* O6 activated at least the ethylene pathway of plant defense. Unlike *P. putida* (Zdor and Anderson, 1992) and the fluorescent pseudomonads tested by Park and Kloepper (2000), there was no stimulation of PR-1a expression indicative of the SA pathway. The protective response induced by *P. chlororaphis* O6 was similar to the effect of *P. fluorescens* WCS417r on *Arabidopsis* (Pieterse et al, 1998), where the ethylene-pathway of defense was activated. However, our findings demonstrate the complexity of the induced resistance response.

Treatment of wild-type tobacco with SA and ACC showed that both chemicals invoked resistance to both pathogens. In contrast, studies in *Arabidopsis*, suggest resistance to soft rot *Erwinia* pathogen involves the ethylene/JA pathway (Norman-Setterblad, et al, 2000) and resistance to *P. syringae*, the SA-dependent pathway (Delaney et al, 1994). Our findings with the ethylene-insensitive tobacco line substantiate the involvement of an ethylene-based pathway in *P. chlororaphis* O6-induced resistance for *E. carotovora*. Also, the lack of SA accumulation in NahG-transformed tobacco did not affect the efficacy of resistance initiated by *P. chlororaphis* O6-colonization towards the soft rot pathogen. Our findings support the concept that resistance against *P. syringae* in tobacco involves different pathways than resistance against *E. carotovora* (Fig. 4). Resistance was not affected by ethylene-insensitivity in the Tetr18 transformed lines. However, the role of an SA-pathway in induced resistance to *P. syringae* is questioned because (1) we failed to observe transcript accumulations for PR-1a and (2) resistance in the plants colonized by *P. chlororaphis* O6 mutant and wild-type strains was still apparent in the NahG-transformed plants. The nature of this induced resistance is unknown at present. However, our findings reiterate that different plants may utilize different pathways for defense against a pathogen. Previous studies have observed that resistance of tobacco and bean to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* required the SA pathway whereas for *Arabidopsis*, the JA/ethylene pathway was more important (De Meyer and Hofte, 1997; Murphy et al, 2000; Thomm et al, 1999).

Other findings that that we cannot explain are (1) why the GacS mutant afforded protection against the wild-fire pathogen but not against the soft rot pathogen in tobacco grown under sterile conditions (Fig. 4) and (2) why colonization by the GacS mutant conferred greater protection against the soft rot pathogen in the SA-deficient NahG transformants than the wild-type line. We speculate that *P. chlororaphis* O6 wild-type induced different responses effective against *Erwinia* than those induced by the GacS mutant. Could the overproduction of siderophore by the GacS strain be involved? Another distinguishing feature of the strains is that on KB medium, the wild-type strain grew as tight colonies whereas the mutant

formed spreading colonies (data not shown), suggesting that cell surface features vary between mutant and wild-type. The nature of the inducing features from *P. chlororaphis* O6/GacS cells is unknown. Our original hypothesis that the phenazines from *P. chlororaphis* O6 were inducers of plant defense was not supported because GacS as well as *P. chlororaphis* O6 stimulated accumulation of PR-1g and HMGR transcripts under otherwise sterile conditions and we have never observed phenazine production with the GacS mutant. Thus, our findings differ from the report of Audenaert et al. implicating phenazine and siderophore as factors that stimulate ISR with a *P. aeruginosa* isolate. However, whether the mutant and wild-type strains differ in other factors that are effectors for plant defense stimulation, flagellins (Gomez-Gomez, 2001) and lipopolysaccharide (Leeman et al, 1995; Van Peer, and Schippers, 1992), has not been studied.

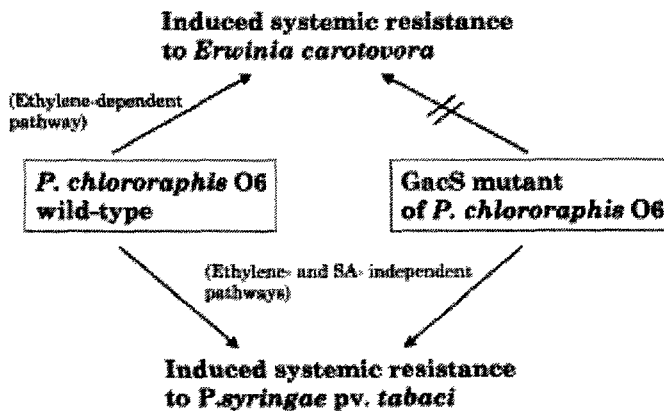


Fig. 4. Summary scheme for defense pathways against two pathogenic bacteria initiated in tobacco by root colonization by the wild-type *P. chlororaphis* O6 and its GacS mutant.



Protection against *P. syringae* in mature plants colonized by the GacS mutant was more variable than that observed with colonization by the wild-type. We speculate that other rhizosphere organisms could be causing this variability. For instance, we observed amongst the competing rhizosphere bacteria *Bacillus* isolates that degraded the acyl homoserine lactones produced by the *P. chlororaphis* O6 strains (data not shown). If traits that are involved in initiation of resistance are regulated through the acyl homoserine lactone system (Chancey et al, 1999), then, because the GacS strain makes acyl homoserine lactones in less quantity than the wild type (data not shown), the GacS mutant cell-interaction with the plant might be more sensitive to the affects of the *Bacillus* species.

In conclusion, we report that root colonization by *P. chlororaphis* O6 stimulated ISR to two leaf pathogens, although by apparently different pathways. An ethylene signaling pathway was needed for protection against the soft rot pathogen whereas ethylene- and SA-independent pathways, of as yet uncharacterized nature, was involved for the induced resistance to the wild fire pathogen. The global regulator protein kinase, GacS, in *P. chlororaphis* O6, was required for protection against the soft rot pathogen but not for induction of resistance to the wild-fire pathogen.

제 5 절 The global regulator GacS of a biocontrol bacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6 regulates transcription from the *rpoS* gene encoding a stationary-phase sigma factor and affects survival in oxidative stress

## 1. Introduction

Certain rhizobacteria stimulate plant growth, produce secondary metabolites antagonistic against soil-borne pathogens, and induce plant disease resistance. *Pseudomonas chlororaphis* O6 (Pc O6) produces phenazines and hydrogen cyanide that antagonize the growth of fungal pathogens (Radtke et al., 1994; Spencer et al., 2003). Colonization of roots by Pc O6 also induces systemic resistance against bacterial leaf pathogens (Spencer et al., 2003). Our studies are directed towards understanding the mechanisms by which the traits involved in the biocontrol potential of Pc O6 are regulated.

In other biocontrol pseudomonads, the two-component GacS/GacA regulatory system controls the expression of secondary components involved in limiting pathogen performance (Heeb and Haas, 2001). GacS is a membrane associated sensor kinase that becomes autophosphorylated through an as-yet unknown environmental stimulus. GacA is activated, by transfer of a phosphate residue from the GacS sensor kinase, to trigger the expression of downstream genes encoding beneficial traits. Enzymes and secondary metabolites controlled by the Gac system that have roles in biocontrol include phenazines, 2,4-diacetylphloroglucinol, pyrrolnitrin, cyanide, exoprotease, and chitinase (O'Sullivan and O'Gara, 1992; Sarniguet et al. 1995; Haas and Keel, 2003). The *gacS* mutants of Pc O6 are deficient in phenazine, protease, and HCN production (Spencer et al., 2003).

Maximum production of such biocontrol-active factors occurs when cells are in transition from exponential-phase to stationary-phase (Sarniguet et al., 1995; Blumer et al., 1999; Whistler et al., 1998). A distinct

sigma factor, RpoS, is required for transcription of many genes in stationary phase. RpoS controls the production of stationary-phase catalases in *Escherichia coli* (Ec) (Loewen et al., 1998) and *Pseudomonas putida* (Pp) (Miller et al., 2001). The RpoS mutant of Pp expressed the manganese superoxide dismutase (MnSOD) isozyme earlier in stationary phase than the wild-type strain, suggesting that the cells of the RpoS mutant were under oxidative stress (Miller et al., 2001). An RpoS mutant of the biocontrol bacterium *P. fluorescens* Pf-5 displays reduced survival under oxidative stress and altered expression of secondary metabolites (Whistler et al., 1998). Western analysis and assessment of promoter activity using a promoter fusion construct showed reduced expression from *rpoS* in *gacA* and *gacS* mutants, and sensitivity to hydrogen peroxide was increased (Whistler et al., 1998). Likewise, Schmidt-Eisenlohr et al. (2003) showed that RpoS declined with culture age in a *gacS* mutant of *Pc* F113, whereas there was a strong increase in the wild-type strain. Similarly, in *Ec*, mutations in the *bacA-uvrY* two-component system lead to increased sensitivity to hydrogen peroxide stress, correlated with reduced expression of catalase (Mukhopadhyay et al., 2000; Pernestig et al., 2001). The BacA-UvrY system is analogous to GacS/GacA in pseudomonads.

In this study, we examined whether the *gacS* mutant of *Pc* O6 also had altered production of enzymes with protective activity against oxidative stress, and whether transcript abundance of *rpoS* was affected. In the course of these studies, we cloned and sequenced the *rpoS* gene and its adjacent genes in *Pc* O6. We found that, unlike other pseudomonads, a sequence corresponding to *rsmZ*, encoding a regulatory RNA involved in the control of expression of GacS/A-responsive genes, was absent downstream of *rpoS* in *Pc* O6.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Bacterial strains, media, and culture conditions

*P. chlororaphis* O6 was classified by fatty acid analysis and 16S rRNA sequence analysis. The *gacS* mutant and complemented strain were

generated from *P. chlororaphis* O6 wild type, as described (Spencer et al., 2003). To generate the mutant, the wild-type *gacS* gene was replaced with *gacS* bearing a kanamycin resistance gene insert (Miller et al., 1997). The mutation was complemented in trans with plasmid pOKB6.3 bearing the intact wild-type gene and a tetracycline resistance gene. Strains were grown on Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989) or King's medium B (KB) broth or agar media at 28 °C. Broth cultures were shaken at 200 rpm at 28 °C. For long-term maintenance, strains were preserved in KB broth containing 15% glycerol (vol/vol) at 70 °C. The cultures were initiated at an OD<sub>600nm</sub> = 0.05. Media were amended with appropriate antibiotics, kanamycin (25 µg/ml), streptomycin (50 µg/ml), or tetracycline (50 µg/ml).

## 2.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments

Cells grown for 24-36 h to late stationary-phase in KB broth were centrifuged, suspended in fresh medium, and adjusted to OD<sub>600nm</sub> = 0.1. Cultures were diluted 1:100 in sterile flasks containing fresh medium and incubated with shaking at 200 rpm at 28 °C. At defined growth phases, aliquots of cultures were transferred into sterile flask medium, treated with 9 or 45 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and incubated at 28 °C with shaking at 200 rpm at 28 °C. At defined times, the suspensions were diluted serially and plated onto LB agar plates containing appropriate antibiotics. Colonies were counted after 2 days of incubation at 28 °C.

## 2.3. Cloning of *rpoS* gene encoding a stationary sigma factor

General DNA manipulations were followed according to Ausubel et al. (1989) and Sambrook et al. (1989). Modifying and restriction enzymes were used as described by the manufacturers. DNA fragments from agarose gels were isolated and purified using a Zymoclean gel DNA recovery kit (Zymo Research, Orange, CA). Southern or colony hybridization was performed using the nonradioactive Genius system (Roche Biochemicals, Indianapolis, IN).

A clone, pOEKRpoS-4.3, containing the *rpoS* gene of *Pc* O6 was

subcloned from cosmid clone pORpoS-1 selected from a cosmid library of partially digested *Bam*HI genomic fragments from *Pc* O6. Clones were selected because of hybridization to a digoxigenin-labeled 3.0-kb *rpoS* probe from *Pp* (Miller et al., 2001). A 3.0-kb DNA subclone was purified using the Zymoclean gel DNA kit and dig-labeled following the instructions of manufacturers. Sequences were obtained using an ABI1301 DNA sequencer with Dye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Nucleotide and deduced amino acid (aa) sequences were analyzed using the web based tools at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and at Expasy (<http://expasy.hcuge.ch/>). The DNA and deduced amino acid sequence of genes adjacent to *rpoS* gene were aligned with previously published information from other *Pseudomonas* species using the BLAST program and data obtained from TIGR. Sequences were deposited as GenBank Accession no. AY336077.

#### 2.4. Transcriptional analysis of the *rpoS* gene by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Expression from the *rpoS* gene was determined by RT-PCR analyses of total RNA isolated from cells of *Pc* O6 strains. Total RNA was isolated by the Trizol<sup>TM</sup> method following the manufacturer's instruction (Gibco BRL, Rockville, MD). Isolated total RNA (200 ng) was added into QuantiTect SYBR Green reverse transcription PCR kit (cat. no. 204243; Qiagen). Specific primers, based on the sequence for the O6-*rpoS* gene, were: forward (5' -GAA GTG CCG GAG TTT GAC AT-3') and reverse (5' -GCA CGA ACT GAA GGT ACA GC-3'). Specific primers for the 16S rRNA gene of *Pc* O6, forward (5' -TGG CTC AGA ACG AAC GCT GGC GGC-3') and reverse (5' -CCC ACT GCC TCC CGT AAG GAG T-3'), were used for an internal standard. The 25- $\mu$ l mixtures were incubated at 50 °C for 30 min for reverse transcription, followed by PCR for 30 cycles with denaturation at 94 °C for 15 s, annealing at 55 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s. A Rotor-Gene 2000 Real-Time Cycler machine (Corbett Research, Australia) was used. Controls consisted of omission of one of the primers and analysis of the RNA without reverse

transcription. Data were analyzed using the software provided by the manufacturer. The results provided are typical of three independent studies.

## 2.5. Assay of peroxidase, catalase, and SOD isozyme production in *Pc* O6 strains

At defined times during culture, cells were harvested by centrifugation at 10,000g for 10 min, suspended in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), and sonicated twice for 10 s with ice water cooling. Sonicates were centrifuged at 13,000g for 30 min and the protein contents of the supernatants were determined using the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL). Bands with peroxidase, catalase, and SOD activities were determined by staining after protein separation by nondenaturing electrophoresis (Katsuwon and Anderson, 1990; MacAdam et al., 1992). Catalase specific activities were measured spectrophotometrically at 240 nm, specifically to monitor the catabolism of hydrogen peroxide, as described (Katsuwon and Anderson, 1990).

## 3. Results and Discussion

### 3.1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensitivity

The *gacS* mutation in *Pc* O6 had little affect on culturability when mid log-phase cells grown in shake culture were exposed to 9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Both the wild type and *gacS* mutant showed a temporary two fold decrease in culturability after 30 min of exposure (Fig. 1A). The mid log-phase complemented mutant cells were slightly more sensitive to the 9-mM treatment (Fig. 1A). This problem of increased sensitivity to oxidative stress in the complemented mutant is correlated with a decrease in transcript accumulation from *rpoS* at this growth phase, as discussed later in the paper. Culturability of the late log- and stationary-phase cells of each strain by 9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was affected less than the mid log-phase cells (Fig. 1B and C). Treatment with a higher dose of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 45 mM

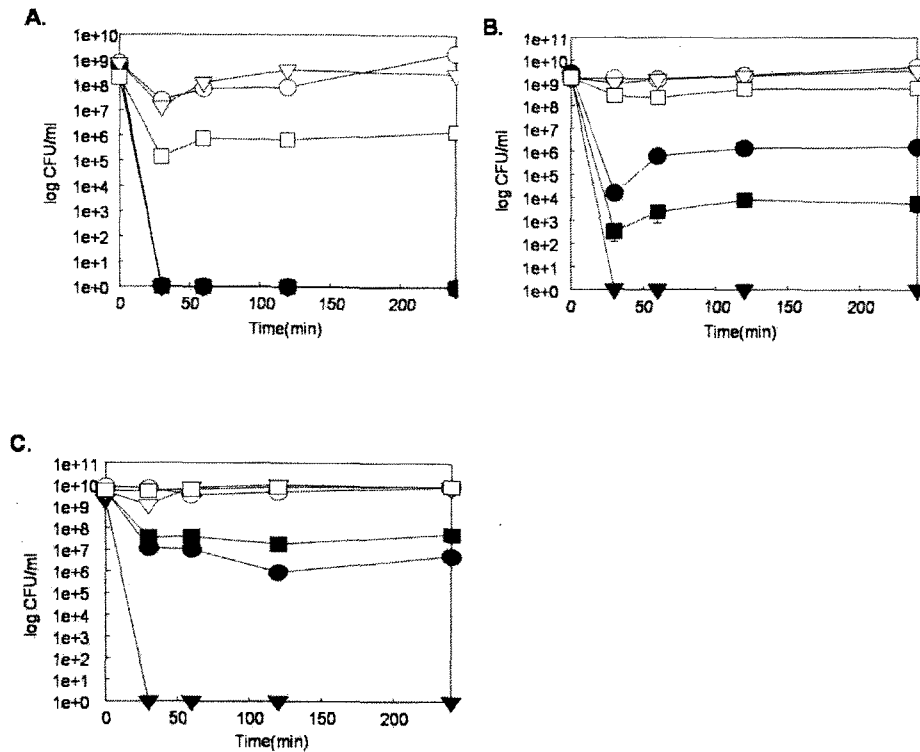


Fig. 1. Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the culturability of mid log-(A), late log-(B), and stationary-phase cells (C) of *Pc* O6 strains. Mid-log-(OD<sub>600nm</sub>= 0.8), late-log-(OD<sub>600nm</sub>= 1.8), and stationary-phase cultures (OD<sub>600nm</sub>>2.4) of wild-type, *gacS* mutant or complemented strains, grown in KB broth, were treated with 9 or 45 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and cultures were shaken at 200 rpm at 28 °C. At defined times after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure, serial dilutions were performed and serial dilutions plated to determine culturability. The data shown are the means from three separated studies and the standard errors, which often are within the symbols. Symbols: circle, wild-type; triangle, *gacS* mutant; rectangle, complemented *gacS* mutant; open symbol, 9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment; filled symbol, 45 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment.

caused complete loss of culturability of all strains when tested in mid log-phase (Fig. 1A-C). However, the wild-type and complemented mutant became more tolerant of the exposure to 45 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as they progressed into stationary-phase (Fig. 1B and C). This growth-phase adaptation to the 45 mM dose was not observed with the *gacS* mutant, which lost all culturability even when stationary-phase cells were tested (Fig. 1C).

### 3.2. Effect of a mutation in *gacS* on peroxidase, catalase, and SOD isozymes

We explored whether there was a change in the level of catalase activity due to the *gacS* mutation that could explain the reduced tolerance of the *gacS* mutant cells to high levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Assessment of catalase activity, through monitoring of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> breakdown, found that catalase specific activities were lower in the *gacS* mutant than in extracts of the wild-type or the complemented mutant. Compared with the wild-type extracts, the activities for the extracts from the *gacS* mutant were 35% that of wild-type for mid log-phase cells, 15% for the late log-phase cells, and 30% for stationary-phase cells (Table 1). This reduction in catalase correlated with the increased sensitivity of the mutant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

To further explore the basis for impaired tolerance to oxidative stress in mature cultures of the *gacS* mutant, we examined the mobility of proteins with catalase activity. Additionally, we studied whether the patterns for activity of peroxidase and SOD, other enzymes that have the potential to alleviate oxidative stress, were altered in the *gacS* mutant. Of the four bands with catalase activity, one, termed band C, was produced equally throughout growth by the wild-type, the *gacS* mutant, and the *gacS*-complemented strains (Fig. 2). Three bands, termed A, B, and D, were produced later in growth phase. Staining for peroxidase showed that the catalase-active bands A, C, and D, from cell extracts of the wild-type and complemented mutant, also had peroxidase activity (Fig. 2), suggesting that these were bifunctional enzymes. Band B from the wild-type and complemented mutant extracts only had catalase activity (Fig. 2).



Table 1. Effect of mutation in *gacS* on specific activities for catalase in *P. chlororaphis* O6

<i>P. chlororaphis</i> O6 strains	Catalase specific activity (U/mg protein) from cells harvested in		
	Mid-log phase	Late-log phase	Stationary phase
Wild-type	48.7 (18.0)	59.5 (16.7)	108.7 (13.9)
GacS-	31.8 (6.2)	51.7 (9.2)	76.5 (11.0)
GacS-com	41.6 (12.1)	66.0 (12.2)	94.7 (8.0)

Cells of wild-type *Pc* O6, the *gacS* mutant (GacS-) and the complemented mutant (GacS-com) were grown on KB to, mid log-phase (OD<sub>600nm</sub>=0.8), late log-phase (OD<sub>600nm</sub>=1.8), and stationary-phase (OD<sub>600nm</sub>=2.4). Extracts were prepared and catalase specific activities, based on total protein in the cell extracts, were determined as described in Materials and methods. The values given are mean of three different extract preparations (standard error).

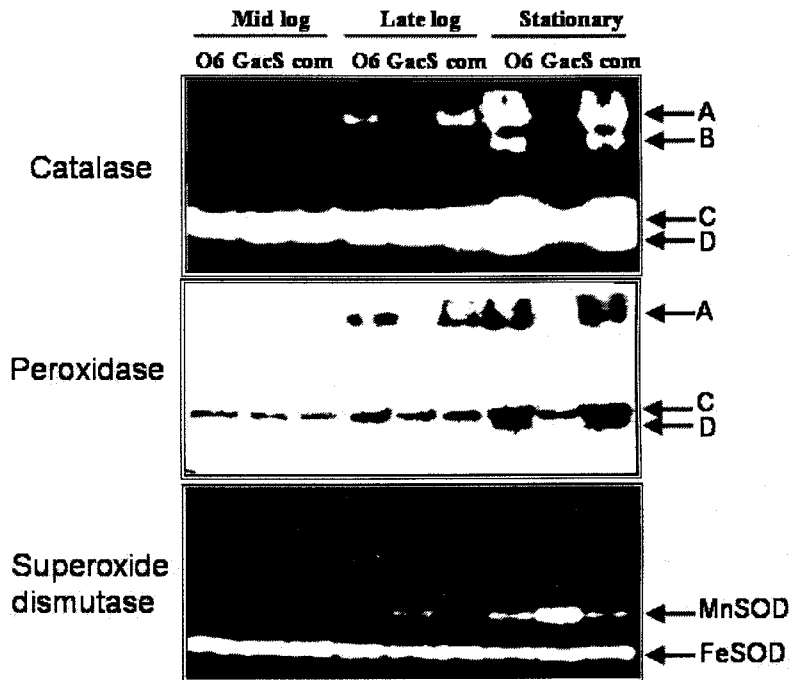


Fig. 2. Effect of the *gacS* mutation on catalase, peroxidase and SOD activities of *Pc* O6. Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis was performed on extracts (10 $\mu$ g protein) from wild-type, *gacS* mutant, and complemented *gacS* mutant of *Pc* O6 using cells harvested during mid-log-(OD<sub>600nm</sub>= 0.7), late-log-(OD<sub>600nm</sub>= 1.8), and stationary-phase (OD<sub>600nm</sub>= 2.4) and grown in KB at 28 °C. Gels were stained for catalase, peroxidase and SOD activities after non-denaturing electrophoresis as described in Materials and methods.

The bifunctional catalase/peroxidase bands A and D and the slower-moving catalase band B were absent in the *gacS* mutant (Fig. 2). The lack of these activities in the *gacS* mutant as cultures age may contribute to the poor resistance of this strain to 45 mM hydrogen peroxide (Fig. 1).

A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive iron superoxide dismutase (FeSOD) isozyme was produced constitutively by each strain (Fig. 2). However, an isozyme unaffected by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MnSOD, was produced earlier in late log-phase cells and, to a greater extent, in the early stationary-phase cells of the *gacS* mutant than wild-type or complemented mutant (Fig. 2). Isozyme identity was confirmed by cloning from *Pc* O6; *sodA*, encoding MnSOD; and *sodB*, encoding FeSOD, and observing isozyme expression in an *Ec sodAsodB*-deficient host (data not shown).

### 3.3. Gene arrangement of *rpoS* region

The alternate sigma factor RpoS controls the expression of genes, including specific catalase and SOD isozymes in other pseudomonads as cell populations mature (Suh et al., 1999; Miller et al., 2001). To initiate *Pc* O6 studies of RpoS regulated gene expression, we sequenced the insert from the plasmid pOEKRpoS-2 containing *Pc* O6 *rpoS*. The gene order, *nlpD*, encoding a structural gene for a lipoprotein upstream of *rpoS*; *fdxA*, encoding ferredoxin; and *mutS*, encoding a mismatch protein downstream of *rpoS* (Fig. 3), agrees with the gene sequence in other pseudomonads and certain enteric bacteria. However, a sequence encoding a small RNA, *rsmZ*, was not apparent between *rpoS* and *fdxA*. Examination of this 129-bp region in *Pc* O6 for RNA secondary structure failed to show the complex multiple stem loop structures correlated with repeats of AGGA identified as an *rsmZ* gene in *P. aeruginosa* PA01, *P. putida* Corvallis (Miller et al., 2001) and KT2440, and *P. fluorescens* CHA0 (Heeb and Haas, 2001). This finding is interesting because the RNA encoded by *rsmZ* is proposed to play a crucial role in depressing the expression of GacA controlled genes (Heeb et al., 2002). Thus, the small RNA is assumed to be an essential

part of the regulation of the genes controlled by the Gac system. Variability in sequence connected with altered pathogenicity is reported for gene insertion in the *rpoS*-*mutS* region for enterobacteria (Herbelin et al., 2000; Martinez-Garcia et al., 2003). Whether *Pc* O6 is unique in the pseudomonads for a lack of an *rsmZ*-like gene at this location awaits additional study. Also, we are determining whether the genes accounting for the catalase and peroxidase-active A, B, and D bands and MnSOD are part of the RpoS-controlled regulon in *Pc* O6.

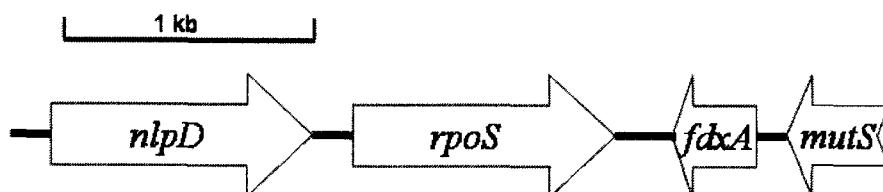


Fig. 3. Gene arrangement of the genomic lesion of *Pc* O6 containing *rpoS* region. Solid lines represent non-coding sequences and arrows indicate orientations of genes.

#### 3.4. Effect of *gacS* on expression of the *rpoS* gene

Transcript accumulation from *rpoS* increased relative to rRNA in the wild-type *Pc* O6 cells as cultures matured from late log-phase to stationary-phase (Fig. 4A). This direct RT-PCR approach at examining the abundance of transcript supported the finding in *P. fluorescens* Pf-5 where an *rpoS* promoter fusion was used (Whistler et al., 1998). No PCR products were obtained when primer 1 for *rpoS* was omitted or the RT step was not performed. In *Pc* O6, the abundance of *rpoS* transcript in late log-phase cells was about four times higher than that of mid log-phase

(Fig. 4B) and decreased slightly in stationary-phase. In the complemented mutant, *rpoS* transcripts also accumulated, but levels were lower in the mid log-phase and stationary-phase cells compared with the wild-type pattern (Fig. 4A). We speculate that the amount of GacS protein generated by the expression from the plasmid-borne gene in the complemented mutant may differ from that of the wild-type.

In turn, this difference seems to affect the expression of genes that are regulated by GacA activation, such as *rpoS*. The presence of *rpoS* transcripts in the *gacS* mutant was reduced by about fourfold in mid log-phase cells, threefold in late log-phase cells, and sixfold in stationary phase cells compared to those of wild-type (Fig. 4A and B). The observation that *rpoS* transcripts were still present in the *gacS* mutant indicates the presence of GacS independent regulation. Possibilities include the signaling molecule ppGpp (Gentry et al., 1993) and the starvation metabolite, polyphosphate (Shiba et al., 1997), if *Pc* O6 resembles the findings in *Ec*. Control through the GacS/ GacA-regulated HSL-dependent mechanism also is suggested (Haas and Keel, 2003; Huisman and Kolter, 1994). We have demonstrated that the rate of HSL production in the *gacS* mutant of *Pc* O6 is reduced compared with the wild-type (data not shown).

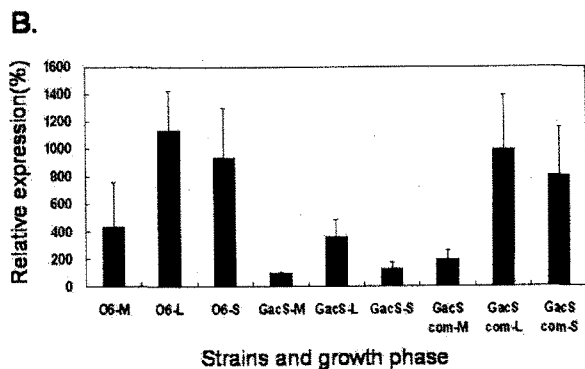
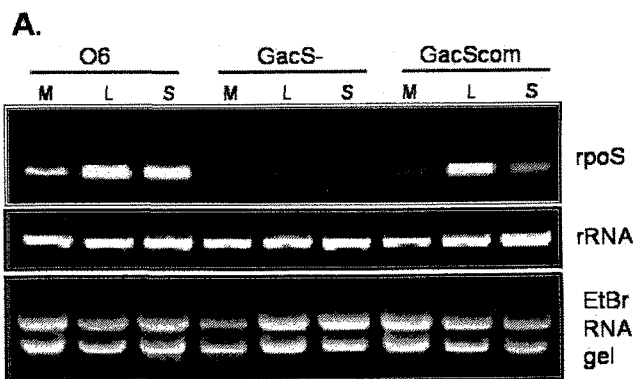


Fig. 4. A mutation in *gacS* affects transcript accumulation of *rpoS* in *Pc* O6. Bacterial cells were grown in KB broth at 28 °C with shaking at 200 rpm. At defined growth stages (M, mid-log-phase cells, L, late-log-phase cells, S, stationary-phase cells), total RNA was isolated and used as templates for RT-PCR analysis as described in Materials and methods. RT-PCR reactions were stopped at the end of the 15th cycle and PCR products were loaded on 1.5% agarose gel (A). The intensity of the PCR products was used to measure relative *rpoS* transcript accumulation in cells of the wild-type, the *gacS* mutant and the complemented strains (B). Levels of *rpoS* transcript for all samples were compared with the level, set at 100%, for the *rpoS* transcript from mid-log-phase cells of the *gacS* mutant. Data shown are for one of three studies that gave similar results.

In summary, GacS, which functions in the two-component GacA-GacS sensor system of *Pc* O6, regulated the transcript level of *rpoS* encoding the stationary-phase sigma factor throughout growth phase. Whether this regulation is directly affecting transcription or increasing transcript stability is unknown at present. Our findings agree with the observations of reduced RpoS levels, assessed by antibody and promoter activity studies, in other pseudomonads lacking the Gac system (Whistler et al., 1998; Schmidt-Eisenlohr et al., 2003), suggesting that post-translational control may not be so important. We correlated the reduced *rpoS* transcript levels in the *gacS* mutant to the failure of mutant cells to increase tolerance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as cell cultures aged, and to the absence of specific stationary-phase catalase and peroxidases. In contrast, another gene involved in protection against oxidative stress and encoding MnSOD was increased in the expression in the *gacS* mutant. These findings suggest that Gac regulation of *rpoS* transcript levels is important in the wild-type cell in controlling responses to oxidative stress, especially in cells that are in starvation. However, perhaps surprisingly, Gac mutants are competitive in the rhizosphere, where they can arise spontaneously (Chancey et al., 2002; Schmidt-Eisenlohr et al., 2003; Spencer et al., 2003). Schmidt-Eisenlohr et al (2003) suggest that the reduced RpoS levels in a *gacS* mutant permit cells to initiate growth from a starved state faster, permitting more rapid colonization than the wild-type. Thus, the interaction between the Gac and RpoS regulons may have survival value for the plant-associated pseudomonads.

## 제 6 절 *Pseudomonas chlororaphis* O6 균주의 sensor kinase인 GacS가 생물적 방제에 관련된 유전자들을 조절하는 global regulator

### 1. 서언

제 4절과 5 절에서 *P. chlororaphis* O6균주의 global sensor kinase가 O6균주의 생물적 방제에 관련된 여러 형질들을 (유도 전신 저항성, phenazine 생성 및 여러 2차 대사 산물) 조절하는 중요한 regulator로서의 가능성을 제시하였다. 본 절에서는 여러 가지 bioassay 시스템을 이용하여 *P. chlororaphis* O6의 GacS 돌연변이에 의해 O6의 내병성 유도 능력이 상실되는지와 O6의 식물생육촉진 능력 등에도 GacS 유전자가 관여하는지 또한 O6의 *gacS* 유전자의 생육시기에 따른 발현 양상 등을 밝혀보고자 하였다.

### 2. 재료 및 방법

#### 가. 사용 균주 및 생육조건.

본 절에 사용된 균주는 제 4절과 5절의 재료 및 방법에 준하여 실시하였고, 4절에서 조제된 *gacS* 돌연변이주와 complemented *gacS* 돌연변이주를 사용하였다.

#### 나. wild type과 *gacS* 돌연변이주의 유용형질 비교.

제 1절에 기술한 방법에 의해 O6균주가 지니고 있는 유용형질 (식물 성장, 세균, 바이러스, 곰팡이병에 대한 내병성, 이차대사 산물 생성)들을 wild type과 *GacS* 돌연변이주를 비교하였다.

#### 다. SEM에 의한 세균의 크기 및 IAA생성 능력 비교

Wild type과 *gacS* 돌연변이주의 형태를 관찰하기 위해서 여러 생육



기의 세포를 LB나 최소배지등에서 생육시키면서 균 현탁액을 취하여 10배씩 희석하여 커버그라스위에서 동결 건조시킨 후 gold staining하여 Scanning Electron Microscope (JSM5410SV, Tokyo, Japan)에서 관찰하였다. Wild-type과 GacS돌연변이 유도체의 식물호르몬인 Indole-acetic acid의 생성을 확인하기 위해 세균을 tryptophan이 첨가된 nutrient broth 배지에서 생육시킨 후, 10,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 세균을 제거하였다. 상등액 2 ml, 100  $\mu$ l phosphoric acid, 그리고 4ml reagent (2 ml 0.5M FeCl<sub>3</sub>와 100 ml의 35% HClO<sub>4</sub>)을 혼합하여 상온에서 25분 배양한 후, 530 nm에서 spectrophotometer를 이용해 흡광도를 측정하였다.

IAA와 유도체의 측정을 위해 HPLC을 이용하였다. 상기의 조건에서 stationary-phase까지 생육시킨 균주의 상등액을 5 N HCl을 이용하여 pH가 2.5나 3.0이 되게 맞춘 다음 동량의 ethyl acetate를 이용하여 추출하였다. 유기용매 층을 증발시킨 다음 1ml 25% methanol와 1% acetic acid (pH4.5)에 녹인 후 HPLC을 실시하였다. Nucleosil 120-5 C18 reverse column (5m, 250X4mm) (Richard Scientific, Novato, CA, USA)을 장착한 600E model HPLC (Waters-Millipore, Milford, MA, USA)에서 73% solvent A (1% acetic acid)와 28% solventB (100% methanol)을 mobile phase로 실시하였다. Flow rate는 0.8ml ml<sup>-1</sup>을 사용하였고, rejection volumn은 30 L이었다. Tryptophan (Trp), IAA, indole 유도체는 model 490E UV monitor (Waters-Millipore)을 이용하여 280nm wavelength에서 측정하였고, retention time과 co-migration (standard)로 확인하였다.

라. Wild-type과 GacS돌연변이주의 뿌리 정착 능력

*P. chlororaphis* O6와 GacS돌연변이주와 complemented 돌연변이주의 오이 뿌리 정착 능력을 조사하기 위해 멸균된 magenta box에 *P. chlororaphis* O6와 GacS mutant를 7일간 멸균된 상태로 생육시킨 오이에 drenching한 후, 0일, 5일, 10일, 15일, 그리고 25일 후에 colony forming unit/g of root를 조사하였다.

균주의 토양 drenching은 *P. chlororaphis* O6와 GacS 돌연변이주를 LB agar plate에 배양하여 균을 백금으로 회수하여 0.02M potassium phosphate(pH7.0)가 500 $\mu$ l 담긴 micro tube에 넣어준 후 vortex하여 현탁액을 조제하여 OD값을 0.1로 맞추어 각 pot당 5 ml씩 drenching하였다.

CFU를 측정하기 위해 0일, 5일, 10일, 15일, 그리고 25일 짜 오이의 뿌리 부분만을 절단하여 멸균수에 현탁하여,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ 으로 희석하여 적당한 항생제가 첨가된 LB agar plate에 100  $\mu$ l씩 도말하여 28  $^{\circ}$ C에서 16시간 배양한 후 형성되는 colony 수를 조사하였다.

#### 마. RT-PCR analysis와 기타 유전자 조작

본 절에서 사용되는 southern hybridization, DNA manipulations, total RNA분리 방법, reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)등의 방법들은 제 3절의 재료 및 방법에 기술한 방법에 준하여 실시하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. *P. chlororaphis* O6의 *gacS* 유전자의 발현 양상

제 3절, 4절, 그리고 5절에 결과에 의하면 *P. chlororaphis* O6의 sensor kinase인 GacS는 주로 stationary-phase에서 유도되는 유전자들을 (*rpoS* 그리고 *phz* operon) 조절하는 global regulator로 작용하는 것 같다. 따라서 *gacS* 유전자가 어느 생육 시기에 가장 발현이 잘되는 지 알아보기 위해 여러 생육기에서 O6균주를 생육시킨 후, total RNA를 분리하여 생육시기별 *gacS* 유전자의 발현 양상을 확인하였다 (Fig. 1). O6균주의 GacS유전자는 late-log와 stationary phase에서 그 발현 정도가 가장 높았으며, mid-log phase에서도 약간은 발현하였다 (Fig. 1). 이러한 결과는 아마도 GacS유전자가 아직까지 알려지지 않은 외부 신호에 반응하여 세균의 생육이 최대에 도달할 때에 활성화되어 GacS에 의해 조절되는 유전자의 전사를 활성화시키는 key global regulator임을 확인시켜주는 결과이다. GacS돌연변이주에서 *phzI*와 *phzA*의 유전자가 O6균주가 stationary phase임에도 유도되지 않은 것은 *phzI*와 *phzA*가 유전자가 유도되기 위해서는 GacS의 활성화가 절대적으로 필요함을 나타내는 결과이다 (제 3절 Fig. 4).

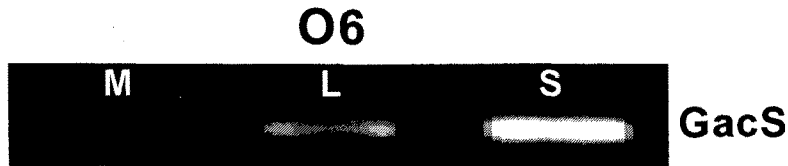


Fig. 1. Expression of *gacS* in *P. chlororaphis* O6 as detected by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis with . *P. chlororaphis* O6 cells were grown to early-log phase (OD600nm=0.1); mid-log (OD600nm=0.7), or stationary-phase (OD600nm>1.5) on LB and total RNAs were isolated and used as template for RT-PCR. The *gacS* gene specific primers (F; 5'-GCA AAC CCA ACT TCT GCA AC-3', R; 5'-GTC CTG CTG TTC CAG GGA CT-3) were used for detection of *gacS* gene in reaction mixture. PCR products from the *gacS* gene is shown.

#### 나. GacS돌연변이에 의해 IAA생성 능력 증가

*P. chlororaphis* O6균주는 담배의 생육을 촉진하는 능력이 있다. 따라서 wild type과 *gacS* 돌연변이주에서 식물호르몬인 Indole-acetic acid (IAA)를 생성하는 지를 측정하였다 (Table 1, Fig. 2). Wild type과 complemented *GacS* 돌연변이주에서는 tryptophan을 첨가 여부에 관계없이 아주 basal level의 IAA을 생성하는 반면에 *GacS*돌연변이주를 tryptophan이 첨가된 배지에 생육시켰을 때 2 - 3일째부터 다른 모든 조건에서 보다 약 10배정도 가까운 IAA의 생성량이 증가됨이 관찰되었다. 그러나 *GacS*돌연변이주를 tryptophan이 첨가되지 않은 nutrient broth에 첨가하였을 때는 이러한 IAA생산량의 증가는 관찰할 수 없다. 따라서 이러한 결과를 종합해 보면 *GacS*는 내병성 유도나 생물적 방제에 관련된 이차대사산물의 생성에 대해서는 positive regulator로 작용하나, IAA의 생성에는 negative regulator로서 작용하는 것 같다.

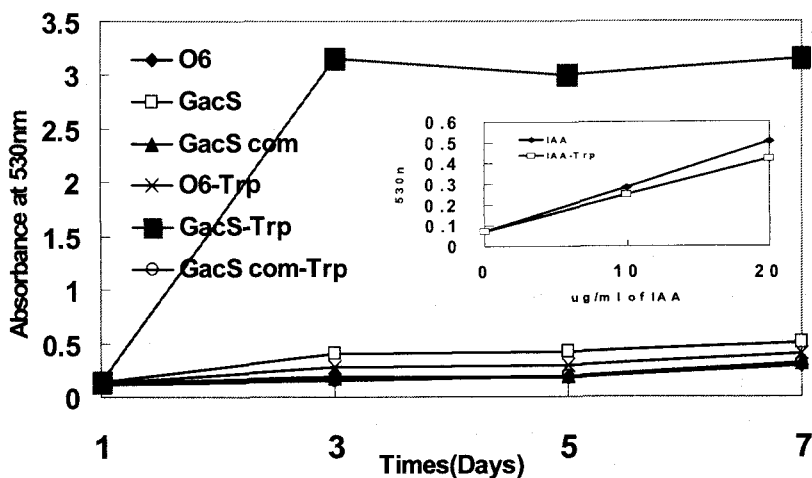


Fig. 2. Chemical assay of IAA production by *P. chlororaphis* O6 wild type, GacS mutant, and complemented GacS mutant. Each strain was grown on nutrient broth with or without tryptophan for defined times. Culture supernatant of each strain was mixed with the reagent for detection of IAA, and read absorbance at 530nm.

Table 1. Effect of mutation of GacS gene on production of IAA in *P. chlororaphis* O6

Strains	IAA production ( $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{OD}_{600}$ unit) <sup>a</sup>		
	Mid-log	Late-log	Stationary
O6	1.8±0.55	2.7±0.85	3.7±0.81
GacS	2.0±0.47	2.8±0.53	2.9±0.65
Com	2.0±0.75	2.5±0.88	4.7±1.03
O6-trp	3.1±0.90	4.3±1.72	5.4±1.81
GacS-trp	3.6±1.70	18.8±2.94	29.6±9.12
Com-trp	2.4±0.75	4.9±2.28	6.1±2.29

<sup>a</sup> Each strain grew on nutrient broth with or without tryptophan, and IAA extracted the method described in Materials and Methods section. The amounts of the extracted IAA were determined using HPLC.

다. GacS돌연변이에 의한 세균세포의 형태 변화

*P. chlororaphis* O6 strain들을 M9 minimal 배지와 LB배지에서 생육을 시키면서 late-log phase 세균의 크기와 길이를 SEM을 통해 측정해 본 결과 *gacS* 돌연변이와 wild type의 직경에는 큰 차이를 보이지 않았으나, *gacS* mutant에서 wild-type보다 2~5배 정도 길이가 길어졌다 (Table 2). 이러한 길이의 신장이 아마도 *gacS* 돌연변이주가 생산하는 IAA의 효과에 의한 가능성을 알아보기 위해 tryptophan의 존재 유무에 상관없이 길이가 길어졌다. 따라서 돌연변이 GacS에 의해 생성되는 IAA가 세균세포의 길이를 신장시키는 데에는 영향을 미치지 못하고, 이와 더불어, 돌연변이주에서 생성된 IAA로 인해 세포의 생존에 미치는 영향은 없었다. 이상의 결과를 종합해 보면 GacS 유전자는 O6균주의 여러 생리적, 형태적 표현형을 지배하는 global regulator로 작용하는 것 같고, 이들에 의해 조절되는 유전자들을 찾아내는 것도 앞으로 수행해야 할 숙제일 것이다.

Table 2. Diameter and length of *P. chlororaphis* O6 wild-type and GacS derivatives<sup>a</sup>

구분	medium	wild-type	GacS	Com	O6-trp	GacS-trp
Length( $\mu\text{m}$ )	LB	1.26±0.06	5.58±0.27	1.33±0.66	1.12±0.03	6.45±0.16
	M9	0.77±0.03	1.95±0.12	0.73±0.04	0.75±0.02	1.95±0.09
Diameter( $\mu\text{m}$ )	LB	0.59±0.02	0.58±0.03	0.59±0.03	0.58±0.03	0.56±0.02
	M9	0.47±0.02	0.47±0.02	0.48±0.02	0.47±0.02	0.47±0.02

<sup>a</sup> Diameter and length of each strain was measured under SEM observation. At least 100 single cells for each bacterial strain was used to measure diameter and length of a bacterial cell.

라. GacS 돌연변이주의 내병성 유도 능력과 뿌리 정착 능력

*P. chlororaphis* O6 균주는 여러 식물 세균병, 곰팡이병, 바이러스병에 대한 내병성을 유도하는 유용형질을 지니고 있다. 제 2절에서 기술한 바와 같이 GacS 유전자가 내병성 유도 능력이 상실된 돌연변이주의 분석을 하는 과정 중에 선발된 유전자이다. 따라서 marker exchange 돌연변이 방법에 의해 조제한 *P. chlororaphis* O6 균주의 *gacS* 돌연변이주의 여러 식물병원균에 대한 내병성 유도 능력에 관련이 있는지 알아보기 위해 여러 가지 bioassay 방법을 이용하여 조사하였다 (Table 3, Fig. 3). 또한 GacS 돌연변이주에서 IAA의 생성량이 증가하여 GacS 돌연변이주가 아마도 식물의 성장을 촉진하는 능력이 증가될 것으로 생각되어 균주를 접종 후 전체 잎면적을 측정하여 식물성장 촉진 능력을 조사하였다 (Table 4).

*P. chlororaphis* O6 wild type 균주는 담배에서 무름병균인 *E. carotovora*와 *Cucumber mosaic virus*에 의한 virus병에 대해서도 유도 전신 저항성을 유도하는 탁월한 능력을 가지고 있었다 (Table 3, Fig. 3). 이에 반해 GacS 돌연변이주는 wild type에 비해 현저히 무름병과 CMV에 대한 병 저항성 유도 능력이 상실하여 negative control의 병 발생량과 비슷한 정도로 병이 발생하였다. 하지만 이런 *gacS* 돌연변이의 병 저항성 유도 능력은 상실은 native *gacS* 유전자에 의한 complementation에 의해 wild type 수준으로 병 저항성 유도 능력이 회복되었다 (Fig. 3, Table 3). 이러한 결과는 *gacS* 유전자가 *P. chlororaphis* O6에서 병 저항성 유도 능력을 나타내는 microbial determinant의 발현이나 생성을 조절하는 주 조절자임을 암시하는 결과이다. 앞으로 *P. chlororaphis* O6 균주의 *gacS* 유전자가 병 저항성 유도 능력을 발휘하는데 어떤 기작에 의해서 관여하는 지등에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Table 3. Effect of mutation of the *gacS* gene of *P. chlororaphis* O6 on induced systemic resistance against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in tobacco<sup>a</sup>

Treatment	Induced resistance by rhizobacteria <sup>b</sup>	
	Disease index (DI)	No. of symptomatic leaf (NS)
89B61	5.89*	3.00*
90-166	2.67*	1.00*
O6	4.33*	1.67*
O6- <i>gacS</i>	6.89	3.00*
Comp- <i>gacS</i>	4.44*	1.89*
DH5a	6.87	3.56
1mM SA	5.22*	3.00*
Control	8.11	4.22
LSD <sub>0.05</sub>	1.84	1.10

The number represent means of 6 replications per treatment. The one plant is one replication.

<sup>a</sup> *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain SCC1 were inoculated on four leaves of two week old tobacco seedling grown in 24 microtiter plates containing 0.5% MS (1.5g sucrose per L).

<sup>b</sup> DI=disease index (0-10), NS=No. of symptomatic leaf (0-10).

\* Means significantly different compared to control at LSD (P=0.05)

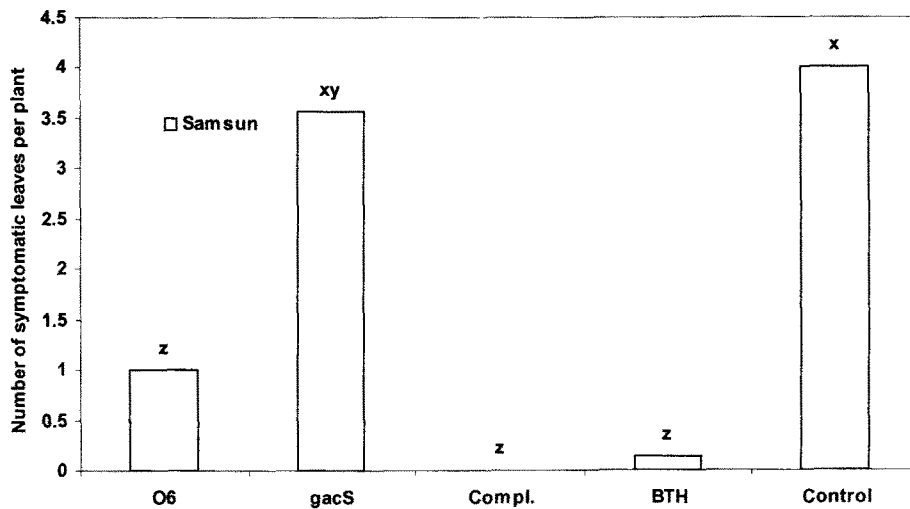


Fig. 3. Effect of mutation of the *gacS* gene of *P. chlororaphis* O6 on induced systemic resistance against *Cucumber mosaic virus* in tobacco two weeks after inoculation. Different letters indicate significant differences between treatments according to LSD at  $P = 0.05$ .

Table 4. Effect of mutation of the *gacS* gene of *P. chlororaphis* O6 on plant growth promotion of tobacco three weeks after CMV inoculation.

Treatment	Total leaf surface area (cm <sup>2</sup> )
O6	71.82b
gacS	94.09c
Compl-gacS	70.52b
1mM BTH	28.31a
Control	73.54b
Mock	63.36b
LSD0.05	17.32

7th and 8th leaves from top per plant were measured. 16 replications per treatment. Different letters indicate significant differences between treatments according to LSD at  $P=0.05$ .



상기의 결과에 의하면 *P. chlororaphis* O6균주의 GacS 돌연변이주에서 식물생장호르몬인 indole-acetic acid의 생성량이 증가되었다. 따라서 GacS 돌연변이주가 생성되는 IAA에 의해 식물의 생장이 촉진될 것으로 사료되어 균주를 접종하고 식물생장 촉진 능력을 측정하였다 (Table 4). 식물병 저항성 유도 능력이 뛰어난 BTH를 처리한 구에서는 식물이 생장이 현저히 감소된 반면, BTH와 비슷한 병 저항성 유도 능력을 나타낸 *P. chlororaphis* O6 처리구에서는 control에 비해 생육의 차이를 보여 주지 않았다 (Table 4). 이와 반해 *P. chlororaphis* O6 *gacS* 돌연변이주는 wild type이나 control에 비해 식물의 생장을 촉진하는 능력이 20 cm<sup>2</sup> 정도 증가되어 뚜렷한 식물 성장 촉진 능력을 보여 주었다 (Table 4). 이러한 GacS돌연변이주에서 식물 성장 촉진 능력이 GacS 돌연변이주가 생성되는 IAA에 의한 것인지 등에 연구가 앞으로 진행되어야 할 것이다.

제 3절, 4절, 5절과 상기의 결과에 의하면 GacS 돌연변이주는 *P. chlororaphis* O6 균주가 지니고 있는 여러 유용형질이 상실되었다. 그 중에서 내병성 유도 능력이 상실된 이유 중의 하나가 *P. chlororaphis* GacS 돌연변이주의 식물 뿌리 정착 능력이 감소하여 내병성 유도 능력을 상실했을 가능성이 있다. 이러한 가능성을 검증하기 위해 *P. chlororaphis* O6, GacS 돌연변이주, complemented GacS 돌연변이주의 오이 뿌리 정착 능력을 비교해 본 결과, non-competitive condition에서는 GacS 돌연변이주의 오이 뿌리에서의 정착 능력이 wild type과 비교해서 차이가 없는 것으로 보아 GacS 돌연변이주에서 내병성 유도 능력이 상실된 것은 GacS 돌연변이주의 뿌리 정착 능력이 감소해서가 아니라 GacS 유전자에 조절되는 내병성 유도 능력과 관련된 microbial determinant가 생성되지 않아서 나타난 결과인 것 같다 (Fig. 4).

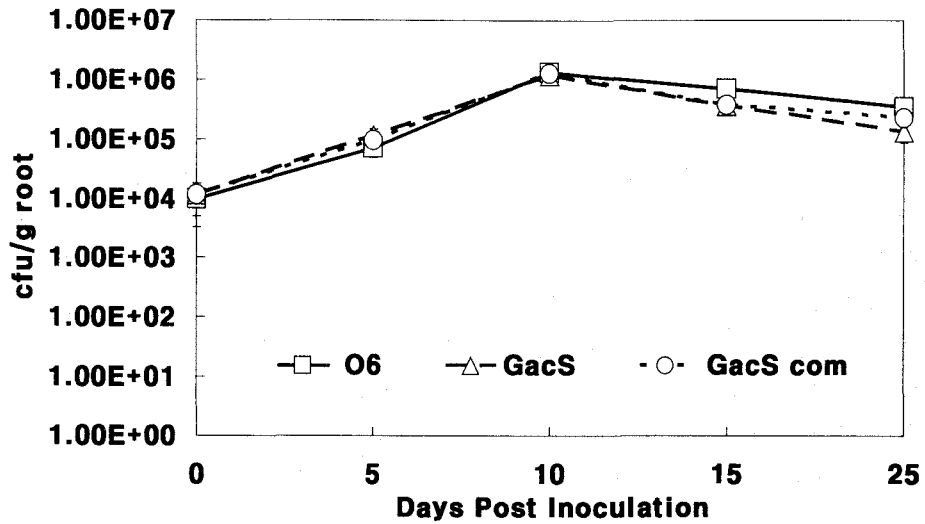


Fig. 4. Comparison of root colonization rate of WT and mutant on cucumber under non-competition condition. Suspension of WT or GacS mutant inoculated by drenching on 7-days old cucumber grown in sterilized condition. WT and GacS mutant recovered from roots at defined times and cfu/g of root was measured by plating of serial dilutions on LB plates. No significant difference between colonization of the root surface by the WT and GacS mutant.

## 제 7 절 *Pseudomonas chlororaphis* O6균주의 Lon protease가 생물적 방제에 관련된 유전자들의 발현을 조절하는 global regulator

### 1. 서언

제 2절에서 *P. chlororaphis* O6균주의 ISR유도 능력이 상실된 돌연변이중 Lon protease에 transposon이 삽입되어 병 저항성 유도 능력이 상실된 돌연변이주 N7이 선발되었다. Lon protease는 일반적으로 non specific하게 손상된 단백질을 분해하는데 관여한다고 알려져 있으나, 아마도 *P. chlororaphis* O6균주에서는 분해하는 단백질들이 조절자로서 작용하여 O6 균주가 지니고 있는 유용형질들을 조절하는 또 다른 global regulator로서 작용할 수 있을 것으로 추정되었고, 아마도 Lon protease는 post-transcriptional regulation이나 post-translation level에서 O6균주의 유용형질을 조절할 것으로 추정되었다.

따라서 본 절에서는 *P. chlororaphis* O6균주의 lon protease를 암호화하고 있는 full length 유전자를 클로닝하고 이들 유전자의 발현 양상을 생육 시기별로 조사하였다. 또한 Lon protease가 *P. chloroaphis* O6의 여러 유용형질을 조절하는 조절자로서 기능을 알아보기 위해 lon 유전자를 marker exchange 돌연변이에 의해 knock out 돌연변이주를 선발하여 이들의 표현형을 조사하였다.

### 2. 재료 및 방법

#### 가. 공시균주 및 배양

본 실험에서 사용한 각 균주의 특징은 Table 1.에 기술하였다. 모든 *E. coli*는 37 °C에서 LB 배지에 배양시켰고, 생물 방제균 *P. chlororaphis* O6와 돌연변이주들은 30 °C에서 LB배지를 사용하였고, 필요에 따라 King's medium B배지를 사용하였다. 선별 과정에서 배지에 첨가하는 항생물질은 Tetracycline(12.5µg/ml), Ampicillin(50µg/ml), Kanamycin(100µg/ml)을 사용하였다 (Sambrook and Russell, 2001). 본 실험에 사용한 모든 균주는 -80 °C에 보관하여 사용하였다.

Table 1. Characteristics of the bacterial strains and plasmids used in this work.

Strains or Plasmids	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Source or reference
<i>P. chlororaphis</i>		
O6	Wild-type, Phz <sup>+</sup> , Pro <sup>+</sup> , HCN <sup>+</sup> , Sider <sup>+</sup> , St <sup>r</sup>	This study
N7	O6::Tn5 Phz <sup>-</sup> Km <sup>r</sup> , St <sup>r</sup>	This study
lon::km	lon::Km, Phz <sup>-</sup> , Pro <sup>-</sup> , HCN <sup>+</sup> , Sider <sup>+</sup> , Km <sup>r</sup> , St <sup>r</sup>	This study
Com- <i>lon</i>	Complemented <i>lon::km</i> mutant	This study
<i>Chromobacter violacearum</i>		
CV026	Mini-Tn5 mutant, HSL <sup>+</sup> , Km <sup>r</sup>	McClellan(1997)
<i>Fusarium oxysporum</i>		
	Plant fungal pathogen	
<i>E. coli</i>		
LE392	Host strain	Promega Corp.
DH5a	Host strain	Sambrook(2001)
Plasmids		
pRK2073	Helper plasmid, Mob <sup>+</sup> , Tc <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup>	Leong(1982)
pRL1063a	Tn5::luxAB, transposon, Km <sup>r</sup>	Wolk(1991)
pRL648	pRL vector containing 0,9kb Km <sup>r</sup> cassette	Wolk(1991)
pLAFR3	<i>IncP</i> , <i>cos</i> <sup>+</sup> , <i>rlx</i> <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	Staskawicz(1987)
pUC19	ColE1 replicon, Am <sup>r</sup>	Sambrook(2001)
pLON1	a cosmid clone containing the full length of lon gene sequence of <i>P. chlororaphis</i> O6	This study
pLON	3.5-kb <i>Xba</i> I - <i>Eco</i> R I fragment containing the Tn5-flanking sequence from pN7B cloned into pUC19	This study

<sup>a</sup>Abbreviations: Phz, phenazine; Pro, protease; HCN, hydrogen cyanide; Sider, siderophore; HSL, homoserin lacton; Km<sup>r</sup>, kanamycin resistance; Am<sup>r</sup>, ampicillin resistance; Sp<sup>r</sup>, spectinomycin resistance; Mob<sup>+</sup>, mobilizing plasmid; Rif<sup>r</sup>, rifampin resistance; St<sup>r</sup>, streptomycin resistance

#### 나. *P. chlororaphis* O6균주의 *lon* 유전자 클로닝 및 돌연변이주 조제

제 2절에서 분리된 Lon protease 유전자가 knockout된 돌연변이주 N7의 Tn5 flanking sequence를 probe로 하여 이미 제 3절에서 조제된 *P. chlororaphis* O6의 genomic library를 screening하여 probe와 hybridize되는 한 개의 cosmid clone을 선발하여 subcloning하였다. 각 clone들의 sequencing 방법은 전남대학교 기초과학지원연구소 광주분소에 의뢰하여 Perkin Elmer사의 자동 염기 서열 분석기(ABI PRISM 377)로 염기 서열 분석을 하였다. 각 염기들은 NCBI (National Center for Biotechnology Information,의 GeneBank database와 BLAST network service를 통해서 분석하였고, ExPASy-translate tool (<http://kr.expasy.org/tools/dna.html>)에서 아미노산 서열로 변형 후 amino acid sequence의 상동성을 blast search에 의해 비교하였다.

위에서 클로닝된 Lon protease 유전자의 기능을 알아보기 위해 kanamycin 저항성 유전자를 selection marker로 해서 marker exchange mutagenesis를 통해 Lon protease 유전자를 knock out시켰다. Lon protease 유전자의 open reading frame의 206 번째 amino acid의 *Nru*I site에 *Sma*I으로 절단한 kanamycin (0.9kb) 유전자를 blunt ligation으로 삽입시켜서 Lon protease를 knock out 시킨 후 marker exchange vector인 pCPP54 vector에 옮긴 후, wild type에 triparental mating에 의해 전이시킨 후, 5% sucrose와 kanamycin이 첨가된 배지에서 돌연변이주를 선발하여 southern hybridization에 의해 최종적으로 Lon protease가 상실된 돌연변이주를 선발하였다.

#### 다. *P. chlororaphis* O6 wild type과 *lon* 돌연변이주의 표현형 비교

제 6 절에 기술한 방법에 의해 *P. chlororaphis* O6균주가 지니고 있는 여러 유용형질 (식물생장, 세균, 바이러스, 곰팡이병에 대한 내병성, 이차대사 산물 생성)과 GacS 돌연변이주에서 상실되거나 변화가 생긴 여러 형질 (세균의 크기, IAA 생성 능력)들은 제 6절에서 기술한 방법에 의해 wild type과 Lon 돌연변이주의 표현형을 비교하였다.

#### 라. RT-PCR analysis와 기타 유전자 조작

본 절에서 사용되는 southern hybridization, DNA manipulations, total RNA분리 방법, reverse-transcription polymerase chain reaction

(RT-PCR)등의 방법들은 제 3절의 재료 및 방법에 기술한 방법에 준하여 실시하였다.

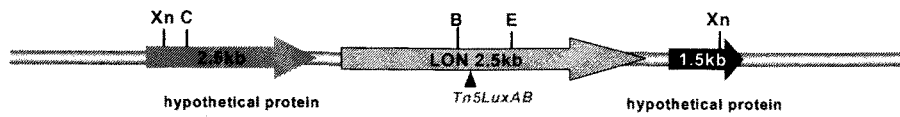
### 3. 결과 및 고찰

가. *P. chlororaphis* O6의 Lon protease의 유전자 분석 및 발현 양상

*P. chlororaphis* O6의 lon protease (*lon*) 유전자의 open reading frame은 2,436 bp이며 812개의 deduced amino acid sequence로 구성되어 subunit의 분자량이 88,960 kDa이었고, theretical pI는 4.88이었다 (Fig. 1). Lon protease의 deduced amino acid 서열을 분석하여 본 결과 세균의 ATP-dependent protease (Lon protease)와 높은 상동성을 보였다. 특히 *P. chlororaphis* O6의 Lon protease 유전자는 *P. putida* KT2440의 ATP-dependent protease와 94%, *P. aeruginosa* PAO1와는 91 %의 높은 상동성을 보였다. 또한 다른 Gram negative bacteria인 *Thermotoga maritima*의 ATP-dependent protease LA 와는 87% 그리고 *Escherichia coli*의 Lon protease(*lon*)와의 상동성은 84%의 상동성을 보였다 (data not shown).

본 절에서 클로닝한 *lon* 유전자의 발현양상을 알아보기 위해 먼저 여러 생육기에서 O6균주를 생육시킨 후, total RNA를 분리하여 생육시기별 *lon* 유전자의 발현 양상을 확인하였다 (Fig. 2). *P. chlororaphis* O6균주의 GacS유전자나 *phzI*, *phzA*의 유전자 발현 양상과 비슷하게 late-log와 stationary phase에서 그 발현 정도가 가장 높았으며, mid-log phase에서도 발현 정도가 낮았다 (Fig. 1). 이러한 결과는 아마도 *lon* 유전자가 *gacS* 유전자와 같이 여러 유전자의 발현을 조절하여 target 유전자의 전사를 활성화시키는 key regulator로 작용하는 것 같다.

Gene organization of the ATP dependent protease region of the *P. chlororaphis* O6



Xn, *Xmn* I ; C, *Cla* I ; B, *Bam*H I ; E, *Eco*R I

Lon protease; pI/Mw: 4.88 / 88960.91

tggagattaagccgggggtggcgtatttggccaggcgtgcatcgcttttcagcacggccagg

E I K P G V A Y L A R R A S L F S T A R

conserved hypothetical protein

gtgttgggtgcacatcttccgcgggtcacgtcggctttgctgaagatctgctggaagtgc

V L V C T S S A V T S A L L K I C W K C

tcgtgggtgacggcggcgaagtgcgcggctctcgggagcgacgccaggaccacggcg

S W V T A A K C A R S S G A T P R T T A

taggtaggtcagcgttcgccttcaccttggccatgtctcggagagctcgttcatcatg

-

ccattcatggcaaacaggatttggcccgtaagtacggcactgttggtcgagcagccg

ttggtgccggaagtcaaccgaaagtgcgcttaccggaggtgccgttggtagtgaggcc

aggaagtgagcggagtgcgcgctgtccttcgaacagcaggttgccccaccacaatcc

ggaccgcctggcgttgggcattgcattgatggaacacgggtgaagagagtaccgaga

agaatccggttcatagcatttgttctcttgggtgcaaaccaatggacaagggttctggc

ccatgtcggcggcagtgggccggttattagtcagccgcccagcttggagtttaggcaga

ttccaagggttccgtgttttttgcattgacattccttgaatagacgggttttatgctgt

ccgctggcgcctgggactgttccgcttccgctcgcgccttgccagccgctgta

cccggcggcagaatgccccatctgccccgctgatgtaaggaagccgatgcctgatcct

M P D P

ATP dependent protease

gttgcagcgttgcgtctagcggccgaagcgtgaccgctccgttttccgctgaacag

V A A S L R L A P E A L T R P F S A E Q

ttcagcttctcgaccaccaatgatttggagcccttccggtgtgcttggccaggaacgt

F S F S T T N D L E P F R G V L G Q E R

gcggtcgaagccttcagttcgggttgccatgccacgccccggttacaacgtcttgtc

A V E A L Q F G V A M P R P G Y N V F V

atgggcgagccggcactggctcgttctcttctcgtcaaacgctacctgaaggctgagggc

M G E P G T G R F S F V K R Y L K A E G

aaacgcctgcagaccggcctcggactgggtctacgtcaacaatttcgatgagccgcccgg

K R L Q T P S D W V Y V N N F D E P R E

ccgcgcgcgtggagctgccttcggggccgcggggcggttcattcagtgacatcaacggc

P R A L E L P S G A A G A F I S D I N G

ctgatcgacaacctgtggcgaccttccggcgggtctcagacatccctcctatcaacag

L I D N L L A T F P A V F E H P S Y Q Q

aagaaaagcccatcgaccgcggttcaaccagcgttacgaccgtgccctcgatgtgatc

K K S A I D R A F N Q R Y D R A L D V I  
gagcgctggcgctggagaaggacgtcgcgctgtaccgcgacagcagcaatatgcttc  
E R L A L E K D V A L Y R D S S N I A F  
accctatgctcgacggcaaggcgctggacgaggcagagtgcgcaactgcccaggcc  
T P M L D G K A L D E A E F A Q L P E A  
gatcgcgagcgtttccacgaggacatttccgcccggaggagcgctcaacgaagaactg  
D R E R F H E D I S A L E E R L N E E L  
gcgagcctgccgcagtggaagcgcgagtgcagcaaccagctgcgtcacctcaacgaagaa  
A S L P Q W K R E S S N Q L R H L N E E  
accatcacctggccttgcagccattgctggcgccgctgtccgagaagtacgggaaaat  
T I T L A L Q P L L A P L S E K Y A E N  
gcccggctgtgtggctacctgcaagccatgcagggtacctgctcaagaccgtggctgag  
A G V C G Y L Q A M Q V Y L L K T V V E  
caactggtggacgacgaagaccgacgcccggccgcaagctgctggaagaacagtat  
Q L V D D S K T D A V A R K L L E E Q Y  
ggtccgagcctggtggtcgccatccggccagtgccggcgccgggtggtgtcgagccg  
G P S L V V G H P A S G G A P V V F E P  
caccgacctacgacaacctgttggccgcatcgaatacagcaccgaccagggcgctc  
H P T Y D N L F G R I E Y S T D Q G A L  
tacaccacttaccggcagctgcgtccgggtgccctgcatacggccaacggcggttctctg  
Y T T Y R Q L R P G A L H R A N G G F L  
atttctgaagccgagaaaatgctcagcgaacccttgtctgggatgccctcaagcggggc  
I L E A E K M L S E P F V W D A L K R A  
ctgcaatcgcgcaagctgaagatggaatcgccgctggcgcaactggggcgctggccacc  
L Q S R K L K M E S P L G E L G R L A T  
gtgacctgaccccgcaacacatcccgctgcaggtcaaggtcgatcatcggtgctcgc  
V T L T P Q H I P L Q V K V V I I G A R

*BamH I*

cagctgtactacacgctgcaggacctggatccggacttccaggaatgttccgctgctg  
Q L Y Y T L Q D L D P D F Q E M F R V L  
gtggacttcgacgaagacatcccgatggtggacgaaagcctcgaacagttcggccagctg  
V D F D E D I P M V D E S L E Q F A Q L  
ctgaaaactcgcacctcgaagaaggcatggcgccgctgaccgaggacgcggtggcacgc  
L K T R T S E E G M A P L T A D A V A R  
ctggcgacctatagcggccggctggcggaacaccagggcgctgtcgccgctattggc  
L A T Y S A R L A E H Q G R L S A R I G  
gatctgttccagctggtcagcgaggcggacttcatccgtcacctggcctcggacgagatg  
D L F Q L V S E A D F I R H L A S D E M  
accgatgccgggcatatcgaacggcgctcaaagccaaggccaccctaccggggggctc  
T D A G H I E R A L K A K A T R T G R V  
tggcgcggtattctcgacgacatgctggcggggatcattctgatcgacaccgatggcgcg  
S A R I L D D M L A G I I L I D T D G A  
gcccgtgggcaagtgaacggcctgacggtgctggaagtggcgactcggccttgggtatt  
A V G K C N G L T V L E V G D S A F G I  
ccggcgcggtattccggccacgggtgatccggggggcagcggtatcgtcgacatcgagcgc



P A R I S A T V Y P G G S G I V D I E R  
 gaggtcaatctcggccagccgattcactccaagggcgtgatgattctcaccggctacctg  
 E V N L G Q P I H S K G V M I L T G Y L  
*EcoRI*  
 ggcagccgttacgcgcaggaattccccctggcgcgtctcggcgagcatcgccctggagcaa  
 G S R Y A Q E F P L A I S A S I A L E Q  
 tcctacgggtatgtcgcgtgggacagtgccgtcgctggggcagggcgtgcacgctgatctcg  
 S Y G Y V D G D S A S L G E A C T L I S  
 gccttgtcgaaaaccccgctcaagcaatgttttgcattaccgggtcgatcaaccagttc  
 A L S K T P L K Q C F A I T G S I N Q F  
 ggcgaagtgcaggcgggttggcgggggtcaacgagaagatcgaaggcttcttccgacctcgc  
 G E V Q A V G G V N E K I E G F F R L C  
 gaagcgcggggcctgacgggcgagcagggcgcgatcattcctcagcgaatgtcgcacc  
 E A R G L T G E Q G A I I P H A N V A T  
 ctgatgctcgacgagaaggtactggcagcgggtccgcgccgggaaattccacgtgtatgcc  
 L M L D E K V L A A V R A G K F H V Y A  
 gtgcgccagggctgacgagggccctgagcctgctggtcggcgagcccggggcagccggat  
 V R Q A D E A L S L L V G E P A G E P D  
 gccgatggccagttcccggaaagcagtggtcaacgcgcgggtggtggagcgtctcggggtt  
 A D G Q F P E G S V N A R V V E R L R V  
 atcgggaaatgatcagcgaggacgatctcaaggaagcggaaaaagagcaggcacaagaa  
 I A E M I S E D D L K E A E K E Q A Q E  
 gcattggcgcaaaccaagccggcatgagctatgccgcggcgagggctcggccttctcgcg  
 A L A Q T K P A -  
 ggcgcccgtccgctggcgtcaatttctcgaatagaccattcggcgcctgttcagccgggt  
 caactttgcttctcagctcttttcttctatctcagggcaggagaacgacagtcgtcact  
 ggatcgaaacagctctcacatgagggtgaataccggatctaccgagggctcggccgatg  
 M

conserved hypothetical protein

tcgcgcaacctctgccttaccgccagtgcttggcctggtcaccggtatcgagtcgagt  
 S R N L C L T R Q C L G L V T R I E C S  
 atccgcccgcctggcgggagataaacggaatgtggaccctactgttcgcggccggaatggcc  
 I R P L A G D N G M W T L L F A A G M A  
 ggtgaacaaccttcggccatcaaggcccaggaccttctcgggtcccagcgtggccgaa  
 G E Q P S A I K A Q G P F C G P S V A E  
 tccatccttgattccatcgtcgaaagcctgaccacccacggctatgaagtggccgacgat  
 S I L D S I V E S L T T H G Y E V A D D  
 ccgcagatctggtgcctgcaccttcaggcgaactacggcagatcaatggcgaacgctgc  
 P Q I W C L H L Q A Q L R Q I N G E R C  
 cgccattgacgcgatctccctttaatccctaccgctgagtcctactcggcgggtggtgga  
 R H

Fig. 1. Restriction enzyme map of pLon containing full length of *lon* protease (A) and nucleotide and deduced amino acid sequence of *lon* gene.

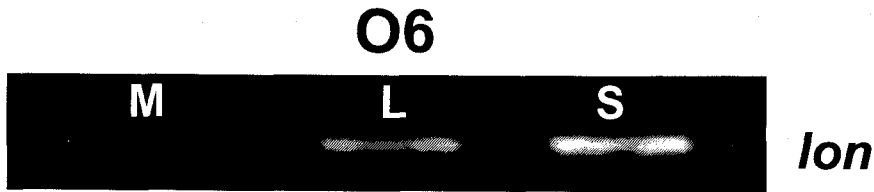


Fig. 2. Expression of *lon* in *P. chlororaphis* O6 as detected by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. *P. chlororaphis* O6 cells were grown to early-log phase (OD<sub>600nm</sub>=0.1); mid-log (OD<sub>600nm</sub>=0.7), or stationary-phase (OD<sub>600nm</sub>>1.5) on LB and total RNAs were isolated and used as template for RT-PCR. The *lon* gene specific primers (F; 5'-CCG GAC TTC CAG GAA ATG T-3', R; 5'-GAG GTG CGA GTT TTC AGC AG-3') were used for detection of *lon* gene in reaction mixture. PCR products from the *lon* gene is shown.

#### 나. Lon 돌연변이주의 조제와 특성 분석

제 1 절의 결과에서와 같이 *P. chlororaphis*는 생물적 방제균으로서 여러 가지 유용한 형질을 발현한다. 따라서 이러한 유용형질의 발현에 Lon protease가 관여하는 지 알아 보기 위해 Lon protease가 knock out된 돌연변이주를 조제하여 wild type과 *gacS* 돌연변이주와의 표현형을 비교하였다. Lon protease돌연변이주는 *gacS* 돌연변이주와 같이 *P. chlororaphis* O6의 유용형질, phenazine, HCN, protease등을 생산하지 못하였고, *F. oxysporium*에 대한 억제 능력도 상실하였다. 이와 더불어 *gacS*돌연변이주에서 생성되지 않았던 세균의 신호전달 물질인 homoserine lactone도 전혀 생산하지 못하였다. 하지만 *GacS* 돌연변이주와 Lon protease돌연변이주의 차이점은 *GacS*돌연변이주에서는 siderophore의 생성이 증가한 반면, Lon protease돌연변이주에서는 siderophore가 생성되지 않았다. 이러한 Lon protease의 형질은 *P. chlororaphis* O6의 native *lon* 유전자에 의해 wild type level로 complement되었다 (Table 1).

Table 2. Phenotypes of wild-type and *lon* derivatives of *P. chlororaphis* O6.

Strains	phenotype					
	Phenazine (mm)	HCN (mm)	Protease (mm)	Siderophore (mm)	HSL	<i>Fusarium oxysporum</i>
O6	+	+	8~10	4~5	+	+
Lon M ( <i>lon::km</i> )	-	-	0	-	-	-
ComLon	-	+	8~10	4-5	+	+

+ : produced or inhibited, - : did not produce or did not inhibit

제 6절에서 *gacS* 돌연변이주는 식물호르몬인 Indole-acetic acid (IAA) 생성이 증가되었다. 따라서 Lon protease의 돌연변이주도 *gacS* 돌연변이주와 같이 IAA의 생성이 증가되는 지를 조사하였다. Wild type과 complemented *lon* 돌연변이주에서는 tryptophan을 첨가 여부에 관계없이 아주 basal level의 IAA을 생성하는 반면에 Lon protease 돌연변이주를 tryptophan이 첨가된 배지에 생육시켰을 때 2 - 3일째부터 다른 모든 조건에서 보다 약 10배정도 가까운 IAA의 생성량이 증가됨이 관찰되었다. 그러나 Lon protease 돌연변이주를 tryptophan이 첨가되지 않은 nutrient broth에 첨가하였을 때는 이러한 IAA 생산량의 증가는 관찰할 수 없었다. 이러한 결과는 HPLC와 TLC을 이용한 연구에서도 동일한 결과를 얻었다 (Fig. 3, Table 3). 따라서 이러한 결과를 종합해 보면 Lon protease도 GacS와 같이 생물적 방제 능력과 내병성 유도 능력에 중요한 *P. chlororaphis*의 이차대사산물의 생성과 내병성 유도 microbial determinant의 생성에 있어서는 positive regulator로 작용하나, IAA의 생성에는 negative regulator로서 작용하는 것 같다. *P. chlororaphis* O6의 여러 유용 형질을 조절하는 GacS와 Lon protease의 상호작용이나 이것에 의해 매개되는 신호전달체계를 밝히는 연구들이 이루어져야 할 것이다.

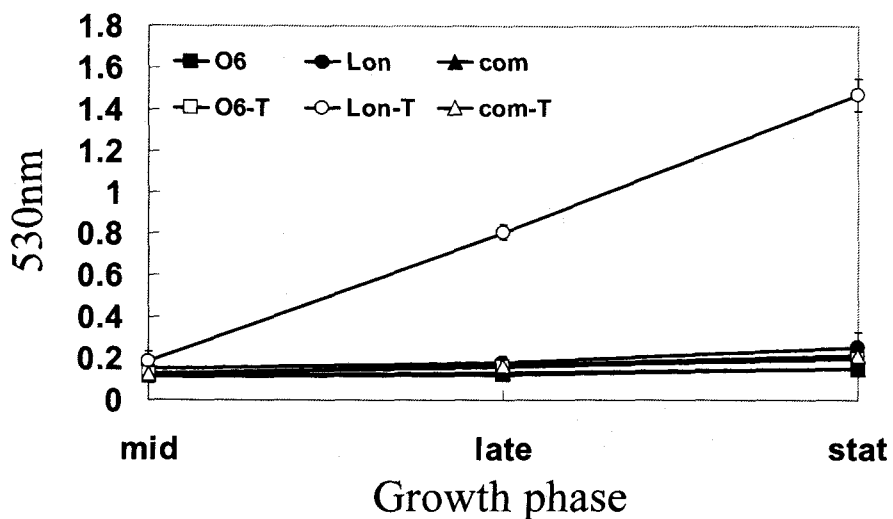
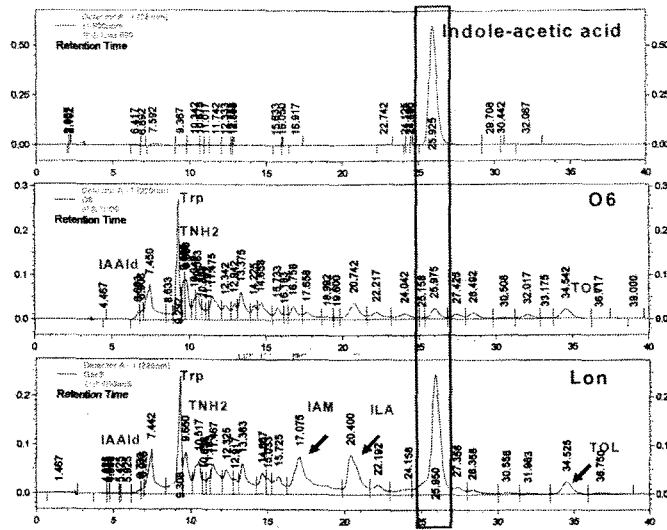


Fig. 3. Chemical assay of IAA production by *P. chlororaphis* O6 wild type, Lon mutant (Lon), and complemented Lon mutant (com). Each strain was grown on nutrient broth with or without tryptophan for defined times. Culture supernatant of each strain was mixed with the reagent for detection of IAA, and read absorbance at 530nm.



**Salkowski reagent**

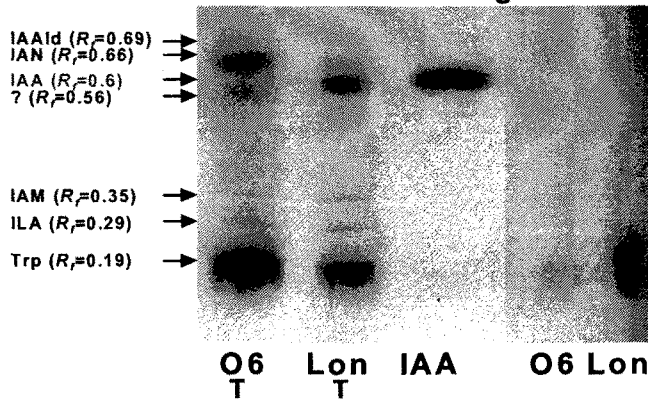


Fig. 4. Detection of IAA production using HPLC and TLC assay by *P. chlororaphis* O6 wild type, Lon mutant (Lon), and complemented Lon mutant (com). Each strain was grown on nutrient broth with or without tryptophan for defined times. The amounts of IAA were determined by HPLC and TLC analysis of the purified IAA derivatives was performed to visualize IAA production.

Table 3. Effect of mutation of Lon protease gene on production of IAA in *P. chlororaphis* O6

Strains	IAA production ( $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{OD}_{600}$ unit) <sup>a</sup>		
	Mid-log	Late-log	Stationary
O6	2.5±0.81	3.2±1.02	4.7±1.07
Lon	4.7±1.59	6.6±2.06	10.8±4.40
Com	2.8±1.09	3.8±1.05	5.0±1.26
O6-trp	3.3±1.05	5.3±2.68	7.8±2.37
Lon-trp	6.9±2.63	42.9±2.06	81.4±4.60
Com-trp	3.5±1.20	5.8±2.87	8.5±2.69

a Each strain grew on nutrient broth with or without tryptophan, and IAA extracted the method described in Materials and Methods section. The amounts of the extracted IAA were determined using HPLC.

제 6절의 결과 SEM을 통한 세균의 크기를 측정하여 본 결과 *gacS* 돌연변이와 wild type의 직경에는 큰 차이를 보이지 않았으나, *gacS* mutant에서 wild-type보다 2~5배 정도 길이가 길어졌다. 따라서 Lon protease 돌연변이주에서도 *gacS* 돌연변이주와 같이 세균의 morphology가 변할 것으로 추정되어 같은 기법을 이용하여 SEM에서 세균의 크기를 측정하였다. Lon protease 돌연변이도 *gacS* 돌연변이주와 같이 wild type의 길이보다 약 2 - 5배 정도 길어졌다 (Fig. 5, Table 4). 이러한 길이의 신장이 아마도 *gacS* 돌연변이주가 생산하는 IAA의 효과에 의한 가능성을 알아보기 위해 tryptophan의 존재 유무에 상관없이 길이가 길어졌다. 따라서 돌연변이 GacS와 Lon protease 돌연변이주에 의해 생성되는 IAA가 세균세포의 길이를 신장시키는 데에는 영향을 미치지 못하고, 이와 더불어, 돌연변이주에서 생성된 IAA로 인해 세포의 생존에 미치는 영향은 없었다. 이상의 결과를 종합해 보면 GacS와 Lon protease 유전자는 O6균주의 여러 생리적, 형태적 표현형을 지배하는 global regulator로 작용하는 것 같고, 이들에 의해 조절되는 유전자들을 찾아내는 것도 앞으로 수행해야 할 숙제일 것이다.

Table 4. Diameter and length of *P. chlororaphis* O6 wild-type and Lon protease derivatives.<sup>a</sup>

구분	medium	wild-type	Lon	Com	O6-trp	Lon-trp
Length( $\mu\text{m}$ )	LB	1.26 $\pm$ 0.06	8.16 $\pm$ 0.11	1.33 $\pm$ 0.66	1.12 $\pm$ 0.03	8.14 $\pm$ 0.13
	M9	0.77 $\pm$ 0.03	2.31 $\pm$ 0.10	0.73 $\pm$ 0.04	0.75 $\pm$ 0.02	2.22 $\pm$ 0.10
Diameter( $\mu\text{m}$ )	LB	0.59 $\pm$ 0.02	0.59 $\pm$ 0.02	0.59 $\pm$ 0.03	0.58 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.02
	M9	0.47 $\pm$ 0.02	0.48 $\pm$ 0.02	0.48 $\pm$ 0.02	0.47 $\pm$ 0.02	0.48 $\pm$ 0.02

<sup>a</sup> Diameter and length of each strain was measured under SEM observation. At least 100 single cells for each bacterial strain was used to measure diameter and length of a bacterial cell.

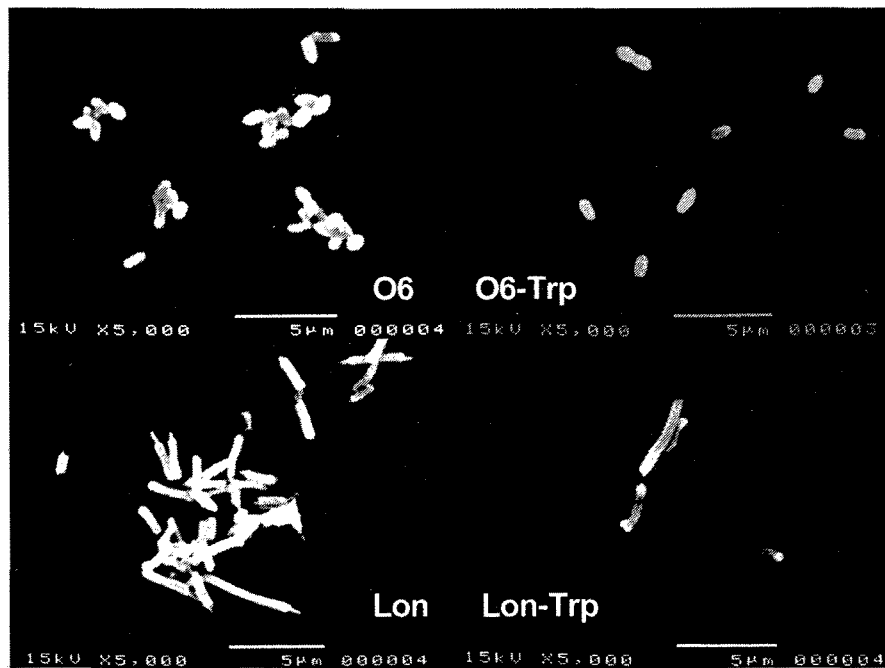


Fig. 5. Effect of mutation of *lon* protease gene of *P. chlororaphis* O6 on morphology of bacterial cell.

지금까지 Lon protease 돌연변이주의 내병성 유도 능력은 담배와 *E. carotovora* subsp. *carotovora*를 이용한 bioassay에 의해서만 조사하였는데, *gacS* 돌연변이주와 같이 무름병에 대한 내병성 유도 능력이 상실되었다. 앞으로 *gacS* 돌연변이주에서와 같이 CMV나 오이 갈반병과 같은 여러 가지 bioassay를 통해 식물병 저항성 유도 능력을 확인할 것이고, 또한 *gacS* 돌연변이주와 같이 담배의 생육을 촉진하는 지도 확인할 계획이다.

지금까지의 연구 결과를 종합해 보면 *P. chlororaphis* O6의 *gacS*와 lon protease 유전자는 O6균주 내에서 아직까지 알려지지 않은 병 저항성 유도 능력을 나타내는 microbial determinant의 발현이나 생성을 조절하는 주 조절자임을 확실하다. 이와 더불어 lon protease와 *gacS* 유전자를 돌연변이를 시킴으로 인해 IAA와 같이 up regulation되어 이들 IAA 생합성 유전자에 대해서는 positive regulator로서 작용할 것으로 추정된다. 현재까지는 어떤 기작이나 신호전달체계를 통해 Lon protease와 *gacS* 유전자가 여러 형질을 조절하는지에 대한 무지한 상태이나, 적어도 Lon protease와 *gacS*에 의해 매개되는 유전자들은 세균이 late log-phase에 도달했을 때 유도되고, cell dependent signal molecule인 homoserine lactone이 아마도 관여할 것으로 추정되었다. 앞으로 *P. chlororaphis* O6 균주의 *gacS*와 lon protease 유전자가 병 저항성 유도 능력을 발휘하는데 어떤 기작에 의해서 관여하는 지등에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

본 연구 결과를 종합해 보면 *P. chlororaphis* O6에서 항생물질 phenazine의 생산과 여러 2차대사물질의 생산은 Lon protease(ATP-dependent serine protease)에 의해 조절된다고 사료된다. 즉 환경적인 자극에 의해 알려지지 않은 signal을 sensor kinase인 GacS (global antibiotics and cyanide)와 반응을 하게 된다. 그러면 phosphorylate된 GacA가 transcriptional regulator인 *luxR*과 sensor *luxI*를 활성화시키고 여기에서 생성된 한 HSL이 다른 HSL 생성을 활성화시키게 된다. 이때 LuxR-HSL complex는 다시 phenazine 등의 여러 2차대사물질과 stress와 관련된 protein들을 조절하는 유전자들의 그룹을 조절하게 된다. 즉 *gacS-gacA*가 일차적인 regulator이고 down-stream에 여러 가지 HSL을 생성하는 LuxR-LuxI와 상동성이 있는 유전자들이 GacS-GacA에 의해 조절된다. 그리고 GacS-GacA가 LuxR-LuxI를 활성화시켜 여기서 생성된 HSL은 각기 다른 유전자들을 조절하게 된다. 이때 Lon protease는 two component system인 GacS-GacA에 의해 LuxR-LuxI를 활성화시킬 때 transcriptional activator로 작용을 한다고 생각된다. 이는 N7 mutant에서 이



*lon*의 활성이 없어 phenazine의 생산이 없기 때문에 이 대사과정에서 activator로 작용할거라 추정된다. Lon protease로 새로운 조절유전자나 생합성 유전자를 찾는데 아주 중요한 재료가 될 것으로 생각된다.

Phenazine 생산에 관련된 또 하나의 global regulator인 ATP-dependent protease (Lon protease)는 필요하지 않은 단백질의 축적을 방지하기 위해서, 또는 아미노산의 재이용을 용이하게 하기 위해서, 언제나 모든 세포에서 분해되고 있다. 분해는 선택적인 과정으로서 모든 개개의 단백질의 수명은 분해를 위한 전문화된 단백질 분해 시스템에 의해서 조절되고 있다. 이것은 번역후의 프로세싱 때에 일어나는 단백질 분해와는 대조적이다. Lon protease에 의해 분해되어지는 조절단백질들은 strain O6를 포함해서 모든 생물체에서 유전자들의 발현을 조절하는 기작으로 중요한 역할을 할 것으로 생각되어 진다. 예를 들어 세균에서 proteolysis는 regulatory transcription factor에 대해 중요한 역할을 한다. 즉 heat shock 반응, stationary-phase와 SOS stress 반응, capsular polysaccharide 생합성을 조절하고, phage  $\lambda$ 의 lysis-lysogeny decision을 조절한다(Gottesman, 1996). 또한 여러 비정상적인 단백질을 분해하는데 관여하는데 이러한 것으로는  $\lambda$  N protein, SulA 세포 분열 regulator, capsule 합성의 positive regulator인 RcsA등이 있다(Gottesman, 1996).

## 제 8 절 Tn5돌연변이에 의한 오이 뿌리 분비액 이용 돌연변이주 선발

### 1. 서 언

*Pseudomonas chlororaphis* O6는 병저항성을 유도할 뿐만 아니라, phenazine, HCN, protease 등의 2차 대사물질을 생성하는 생물적 방제균이다. 이러한 생물적 방제균을 실제 포장에서 사용하고자 하였을 때, 가장 문제시 되는 점 중의 하나가 미생물의 식물뿌리에 정착하는 능력이다. 생물적 방제균으로서의 활성을 나타내기 위해 미생물이 식물뿌리에 정착할 경우 식물의 뿌리 분비액을 주요한 carbon과 energy source로서 이용한다.

식물 뿌리에 서식하는 *Pseudomonas*나 *Serratia* 등의 몇 가지 식물근권 세균(rhizobacteria)들을 이용하여 식물병을 방제하는 연구가 활발히 진행되어 여러 가지 rhizobacteria가 상품화되어 가고 있고 그 효능도 실제 포장에서 확인되었다 (Kloepper et al. 1980; Kloepper et al. 1992; Van Loon et al. 1998; Wei et al. 1996). 이러한 식물 근권 세균들은 주로 뿌리 주위에서 서식하지만 그들이 존재하지 않는 잎에 발생하는 병의 감소까지 가져오는 전신적인 병 저항성(Induced systemic resistance)을 유도하는 능력이 있다(Glick and Bashan 1997; O'Sullivan and O'Gara 1991). 그러나 이들 rhizobacteria를 농업에 이용하는 것은 아직까지는 초보단계이다. 그 근본적인 이유는 아마도 아무리 능력이 탁월한 rhizobacteria를 분리하여 확보하였다더라도 이들을 작물의 근권에 정착시킬 수 없었기 때문일 것이다.

미생물의 식물뿌리 정착 능력은 많은 식물-미생물 상호작용에서 아주 중요한 factor로, rhizobacteria를 실제 포장에서 사용하고 하였을 때 가장 문제가 되는 점 중의 하나이다(Glick and Bashan 1997). Rhizobacteria를 포장에 사용하고 그들의 능력을 증가시키기 위해서 식물뿌리 정착에 관련된 연구나 이에 관련된 세균의 유용 유전자의 발현 및 특성을 밝히는 연구가 절실히 필요하다. 지금까지 연구된 바에 의하면 일반적으로  $10^5$  colony forming unit/g of root 농도 이상의 rhizobacteria가 뿌리에 존재하였을 때 식물 병 저항성이 유도되고 그 이하인 경우에는 저항성이 유도되지 않아 병 저항성을 유도하는 rhizobacteria의 식물정착 능력이 아주 중요한 요인 중의 하나로 작용하였다(Liu et al. 1995; Rmamotoy et al. 2000; Van Loon et al. 1998). 다른 식물종이나 품종에 따라 뿌리에 서식하는 유용미생물에 반응하고 미생물의 생육을

support하는 능력이 다르며 식물 종에 따라 rhizobacteria의 유전자의 발현도 달라진다. 생물적 방제균인 *P. fluorescens*의 항균물질인 pyoluteorin 생합성 유전자 발현도 접종한 식물 종에 따라 달라졌다(Bull et al. 1991; Gamliel and Katan 1992). 이와 같은 결과로 볼 때 다른 식물 종이나 품종에 따라 뿌리 분비물의 조성이 달라 특정 미생물의 생육을 support하고 그 조성에 따라 유용 유전자의 발현이 달라진 것으로 추정된다. 식물체가 분비하는 영양분의 조성이나 그 영양분을 식물체표 서식균이 이용하는 방법에 대한 연구는 미미한 형편이다. 최근에 발표된 논문에 의하면 식물체표면 서식균인 *P. putida*는 식물체에서 분비하는 proline을 이용하는 유전자의 기능이 식물체 정착에 아주 중요한 역할을 할 것으로 추정되었다(Vilchez et al. 2000). 또한 생물적 방제균인 *P. fluorescens*는 아미노산 생합성 유전자들이 토마토뿌리에 성공적인 정착을 위해 필요한 유전자라고 보고되었다(Simons et al.1997). 그러나 고기능 rhizobacteria의 식물 정착, 특히 뿌리 분비액의 이용에 관련된 연구는 전무한 상태이고 이들 뿌리 분비액에 존재하는 물질중에 rhizobacteria의 식물 정착에 필수적인 영양분을 규명하는 등에 관한 연구는 이들 rhizobacteria를 실제 포장에서 실용화하는데 필수적인 연구 분야이다. 따라서 본 실험은 국내에서 많이 재배되어 지고 있는 작물인 오이로부터 뿌리 분비액을 분리하여 이들의 조성을 비교하고, 고기능 생물적 방제균인 *P. chlororaphis* O6를 transposon mutagenesis에 의해 선발된 돌연변이주들을 오이 뿌리분비액에서의 생육정도를 조사하여 뿌리분비액 이용에 이상이 생긴 돌연변이주의 선발함으로써 뿌리 분비액 이용에 관련된 유전자를 탐색하기 위해 실시하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 공시균주 및 배양 방법

본 실험에서 사용한 균주들의 특징은 Table 1. 에 기술하였다. 모든 *E. coli*는 37 °C에서 Luria-Bertani (LB) 배지 [Bacto-trypton 10g, Bacto-yeast extract 5g, NaCl 10g, Distilled water(L)] 에 배양 시켰고, 생물적 방제균 *P. chlororaphis* O6와 Tn5 mutant는 30 °C에서 LB배지를 사용하였다. 항생물질은 Streptomycin (50 µg/ml), Ampicillin (50 µg/ml), Kanamycin (100 µg/ml)을 사용하였다 (Sambrook and Russell, 2001). 본 실험에 사용한 모든 균주들은 25% glycerol에서 -80 °C에 보관하면서 사용하였다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strains or plasmids	Relevant characteristics	source or reference
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>		
O6	Wild-type, Str, Amr, ISR <sup>+</sup> , Phz <sup>+</sup>	Kang(2001)
H10	O6::Tn5, Str, Amr, Kmr, fast growing mutant in cucumber roots exudates	This work
D1	O6::Tn5, Str, Amr, Kmr, slow growing mutant in cucumber roots exudates	This work
C2	O6::Tn5, Str, Amr, Kmr, not growing mutant in cucumber roots exudates	This work
<i>Escherichia coli</i>		
DH5a	Host strain	BRL
Plasmids		
pNH10	Kmr, plasmid containg flanking sequence of H10	This work
pND1	Kmr, plasmid containg flanking sequence of D1	This work
pEC2	Kmr, plasmid containg flanking sequence of C2	This work
pRK2013	Helper plasmid, Km <sup>+</sup>	Kim(2001)
pRL1063a	Tn5::luxAB, transposon, Km <sup>+</sup>	Wolk(1991)

Amp: ampicilin, Sm: streptomycin, Km: kanamycin

#### 나. 작물의 뿌리 분비액 조성 조사

공시작물인 오이 백성 품종을 2% sodium hypochlorite에서 10분 동안 상온에서 50rpm으로 shaking하면서 표면 살균하였다. 살균된 종자는 멸균수에 20분씩 3차례 담궈 sodium hypochlorite를 씻어내어 건조시킨 후 TKS2와 버미큐라이트를 7:3으로 섞은 멸균된 상토에서 6주 동안 25 °C, 90% RH, 12 hr light/ 18 hr dark growth chamber에서 생육시켰다. 자란 오이 식물체의 뿌리 부분만을 절단하는 조건으로 멸균된 증류수에 2시간동안 shaking한 후 상토는 centrifuge하여 제거하고 용출된 뿌리 분비액들을 0.2 µm vaccum filter를 이용하여 멸균시킨 후 동결 건조하여 농축된 분비액을 사용하였다.

오이에서 추출한 뿌리 분비액의 유기산을 측정하기위해 Shimazu SPD-10A UV-Vis detector 210nm에서 Shimazu LC-10AD pump와 colomn RS pak KC-811(shoden Inc.)을 장착한 Shimazu HPLC로 측정하였다. 분비액

은 25배나 50배 희석하여 희석액 20  $\mu\text{l}$ 를 HPLC를 통과시켰다. HPLC 측정 조건은 먼저 mobile phase로 0.1%  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$ 를 사용하였으며, 온도는 25  $^{\circ}\text{C}$ , flow rate는 0.5 ml/min, pressure는 1.6 MPa 조건 하에서 실시하였다. 측정된 유기산은 standard 유기산의 retention time과 비교하여 동정되었고, 유기산 함량은 chromatogram의 peak area를 standard와 비교하여 그 함량을 계산하였다. 당의 조성은 chemical method인 ANTHRONE ASSAY 방법을 이용하여 오이 뿌리분비액 200  $\mu\text{l}$ 에 ethanol (80%)을 800  $\mu\text{l}$  넣어서 잘 섞어준 후 7 ml의 anthron solution (멸균수 214ml에  $\text{H}_2\text{SO}_4$  785ml을 넣어서 ice bath에서 식힌 후 anthron을 2g 넣어 갈색병에 담아 상온에서 보관)을 넣어서 10분 동안 boiling 한 후 ice에서 식힌 sample을 spectrophotometer를 이용하여 absorbance 625nm에서 측정하였다. standard로 glucose와 fructose를 위와 같은 방법으로 측정하여 그 함량을 계산하였다.

다. 오이뿌리 분비액을 영양원으로 이용하는데 이상이 생긴 돌연변이주 선발

추출된 오이뿌리 분비액을 96 wells ELISA plate에 200  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 후, 상기 2절에서 선발된 transposon pRL1063a를 이용하여 조제된 *P. chlororaphis* O6 Tn5 mutant를 각각 접종하여 진탕배양기 (28  $^{\circ}\text{C}$ , 150rpm)에서 16시간 배양하였다. ELISA Reader를 이용하여 550nm에서 optical density (OD)를 측정하여 wild-type인 *P. chlororaphis* O6에 비해 생육이 빨라지거나, 느려지는 등 뿌리분비액을 영양원으로 이용하는데 이상이 생긴 돌연변이주를 선발하였다.

라. *P. chlororaphis* O6과 뿌리분비액 이상 돌연변이주들의 성장능력 비교

1). 뿌리분비액에서의 성장

*P. chlororaphis* O6과 선발되어진 mutant들을 오이뿌리 분비액을 영양원으로 하여 배양하여 colony forming unit(CFU)/ml을 조사하여 뿌리 분비액에서의 성장능력을 비교하였다. CFU를 측정하기 위해 오이 뿌리 분비액을 멸균한 test tube에 10ml씩 넣고 24시간동안 LB에서 배양한 *P. chlororaphis* O6와 mutant들을 각각 원심 분리하여 멸균수로 3번 washing한 후 OD=600nm 0.1이 되도록 희석하여 10  $\mu\text{l}$ 씩 접종하였다. 접종 후, 0시간, 6시간, 12시간, 24시간, 36시간 그리고 48시간 간격으로  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ 으로

회석하여 적당한 항생제가 첨가된 LB agar plate에 100  $\mu$ l씩 도말하여 28  $^{\circ}$ C에서 16시간 배양한 후 형성되는 colony 수를 조사하였다.

## 2). Nutrient-rich LB broth에서의 생육

LB broth 5ml에 *P. chlororaphis* O6와 선발되어진 mutant들을 각각 24시간 배양한 후, OD값을 0.1로 희석하여 LB broth 100 ml에 10  $\mu$ l씩 접종하였다. 진탕배양기 (28  $^{\circ}$ C, 200rpm)에서 배양하면서 0시간, 6시간, 12시간, 24시간, 36시간 그리고 48시간 후에 배양액을 1 ml씩 취해서 optical density를 Absorbance 600nm에서 측정하였다.

## 3). 최소배지에서의 생육

*P. chlororaphis* O6와 선발되어진 mutant들을 다양한 carbon source의 이용여부에 대해 조사하기 위해, 유기산으로는 0.2% malic acid, fumaric acid, succinic acid, benzoic acid 그리고 citrate, 당으로는 glucose를 각각의 carbon source로 첨가하여 1.5%의 agar를 함유한 M9 minimal plate에 접종하여 28  $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후 생장을 조사하였다.

## 마. 병저항성 유도능력 조사

C2 mutant의 병 저항 유도 능력 여부를 조사하기 위해 오이 식물체를 growth chamber에서 2주 동안 키운 후 *P. chlororaphis* O6와 C2 mutant를 각각 OD600=0.4로 조절하여 30ml씩 오이 식물체에 분주한 후 1주일을 더 성장시켰다. 105 spores/ml의 오이 갈반병균인 *Corynespora cassiicola* CM2000-1 (Kwon, 2002)을 접종하여 30  $^{\circ}$ C의 dew chamber에서 12시간동안 처리한 3일 후에 잎에 발생하는 병반수를 조사하였다. 갈반병 *Corynespora cassiicola*는 Czapek solution agar(CSA; Difco)를 사용하여 28  $^{\circ}$ C에서 2주 동안 배양한 후, 기중균사를 흐르는 수돗물에서 멸균한 붓으로 제거한 후 건조시켰다. 그 후 형광등이 조사되는 항온기 (25  $^{\circ}$ C)내에 6일간 배양한 후 형성된 분생포자를 멸균수로 회수하여 사용하였다.

#### 바. 오이 뿌리 정착 능력

*P. chlororaphis* O6와 C2 mutant의 오이 뿌리 정착 능력을 조사하기 위해 멸균된 magenta box에 *P. chlororaphis* O6와 C2 mutant를  $10^5$ cfu/seed로 종자 코팅하여 0일, 5일 그리고 10일 후에 colony forming unit/g of root를 조사하였다.

종자코팅은 *P. chlororaphis* O6와 C2 mutant를 LB agar plate에 배양하여 균을 백금으로 회수하여 0.02M potassium phosphate(pH7.0)가  $500\mu\text{l}$  담긴 micro tube에 넣어준 후 vortex하여 현탁액을 조제하여 OD값을 0.1로 맞추었다. 여기에 2% sodium hypochlorite로 표면 살균된 종자를 넣고 다시 2% methyl cellulose  $500\mu\text{l}$ 를 넣어 잘 섞어 준 후 petri dish에 담아 건조시킨 후 사용하였다.

CFU를 측정하기 위해 0일, 5일 그리고 10일 간격으로 뿌리 부분만을 절단하여 멸균수에 현탁하여, 10배씩 희석하여 적당한 항생제가 첨가된 LB agar plate에  $100\mu\text{l}$ 씩 도말하여  $28\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 16시간 배양한 후 형성되는 colony 수를 조사하였다.

#### 사. DNA 조작과 southern analysis

DNA 전기영동, plasmid 분리, 제한효소절단, 형질전환, cloning 및 subcloning에 필요한 방법은 Ausubel (1991)과 Sambrook 등 (2001)의 방법에 준하여 실시하였다.

Tn5 *luxAB*의 삽입 부위를 가진 돌연변이 균주를 확인하기 위하여 뿌리 분비액 이용에 관련된 돌연변이주들의 Southern 분석을 하였다. Mutant들의 genomic DNA는 hexadecyltrimethyl-ammonium bromide(CTAB) 방법에 의해 분리하였다 (Ausubel et al., 1989). 돌연변이주들을 LB Broth에서 배양한 후 5000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 침전된 세균 세포를 회수한 후 20%(v/v) glycerol로 씻었다. 침전된 세균 세포를 9.5 ml TE(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) buffer로 현탁하고 0.5 ml 10% SDS로 분해하였다. 50  $\mu\text{l}$  proteinase K (20 mg/ml)로 단백질을 제거하였다. Exopolysaccharide 같은 불질들을 제거하고 DNA를 정제하기 위해 1.8 ml 5M NaCl과 1.5 ml CTAB/NaCl solution을 첨가하여 혼합하고 동량의 chloroform/isoamylalcohol (24:1)을 첨가하여 20분간 5,000rpm에서 상층액을 회수하였다. 그리고 나서 상층액으로부터 DNA를 isopropanol을 첨가하여 침전시키고, 70% ethanol로 씻

고 건조하여 TE buffer에 녹여 사용하였다.

Southern hybridization을 하기 위하여 kanamycin을 가지고 있는 pRL648에서 0.9kb *Xba* I -*Bam* H I fragment의 kanamycin 유전자 (Wolk, 1991)를 probe로 사용하였다. Tn5 mutant의 genomic DNA를 *Eco*R I 과 *Sal* I 으로 절단하고 0.7% agarose gel상에서 전기영동 하였다. Genomic DNA들은 positively charged nylon membrane (Roche, USA)으로 alkaline blotting에 의해 옮긴 후, membrane을 20×SSC (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7.0)에서 2×SSC로 washing하였다. 이 membrane을 prehybridization buffer [50%(v/v) formamide, 5×SSC와 0.1%(w/v) N-lauroylsarcosine, 0.2%(w/v) SDS, 5%(w/v) blocking reagent와 배양하여 2시간 동안 55 °C에서 prehybridization시켰다. 이 membrane을 dig-labeled된 probe가 포함된 hybridization buffer와 함께 하루 저녁 반응시켰다. 이 membrane을 상온에서 50 ml의 washing buffer (2×SSC와 0.1%(w/v) SDS)를 각각 2번씩 씻었다. 이것을 다시 15분 65 °C에서 50 ml의 washing solution (0.1×SSC와 0.1%(w/v) SDS)로 씻었다. Membrane을 anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate를 처리한 후, chemiluminescent 방법을 사용하여 detection하였다. Chemiluminescent 방법에 의한 immunological detection 된 membrane을 Lumi-phos 530(Roche, USA)에 적신 후 acetate film 사이에서 30분 37 °C에서 반응시킨 후 상온에서 X-Ray film (Roche, USA)에 노출시켰다. 이 film을 developer에서 4분 동안 반응시킨 후 30초 동안 stop bath에 반응시키고 fixer에 2분, running tap water에서 10분 반응시켜 현상하였다.

아. 뿌리분비액 이용 돌연변이주의 Tn5-flanking region cloning 및 sequencing

#### 1). Cloning

Transposon pRL1063a는 *luxAB*와 origin을 transposable element안에 가지고 있어서 Tn5가 삽입된 mutant 선발 시 luminosecense 측정에 의해 Tn5의 삽입여부를 확인할 수 있고 돌연변이주의 Tn5-flanking sequence는 transpon을 자르지 않는 제한효소를 이용해서 절단한 후 self ligation하여 *E. coli*에 transformation하여 Kanamycin (50 µg/ml)이 첨가된 배지에서 mutant를 선발하여 확인할 수 있다 (Fig.2). Transposon이 삽입된 *P. chlororaphis* O6의 genomic DNA는 CTAB/NaCl의 방법으로 분리하였다. 분리된 DNA는



transposon을 절단하지 않은 enzyme인 *Nsi* I, *Cla* I, *Dra* I, *EcoR* I 으로 각각 처리하여 37 °C에서 12시간 절단하였다. 절단된 DNA는 ligation kit (Takara Inc.)를 이용하여 self ligation하고 DH5a에 transformation시켰다. Kanamycin (50 µg/ml)이 첨가된 LB 배지에서 선택된 clone의 Alkaline 방법에 의해 (Ausubel et al.,1991) plasmid를 추출하여 *Nsi* I, *Cla* I, *Dra* I, *EcoR* I 의 제한효소로 처리한 후 agarose gel에 전기영동을 실시하여 size를 확인하였다.

## 2). Sequencing

뿌리분비액 이용에 관련된 유전자를 밝히기 위해 *P. chlororaphis* O6의 Tn5 flanking sequence의 염기서열을 분석하였다. 각 clone들의 sequencing 은 전남대학교 기초과학지원 연구소 광주분소에 의뢰하여 Perkin Elmer사의 자동 염기서열 분석기(ABI PRISM 377)로 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석은 transposon에 있는 primer(oMP458 : 5'-TAC TAG ATT CAA TGA G-3', oMP459 : 5'-AGG AGG TCA CAT GGA ATA TCA GAT-3')를 제작하여 염기서열을 분석하였다. 각 염기들은 NCBI(Nation Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 Blast Search를 이용하여 분석하였고, ExPasy(<http://kr.expasy.org/tools/dna.html>)에서 아미노산 서열로 변형 후 아미노산의 상동성을 blast search에 의해 비교하였다.

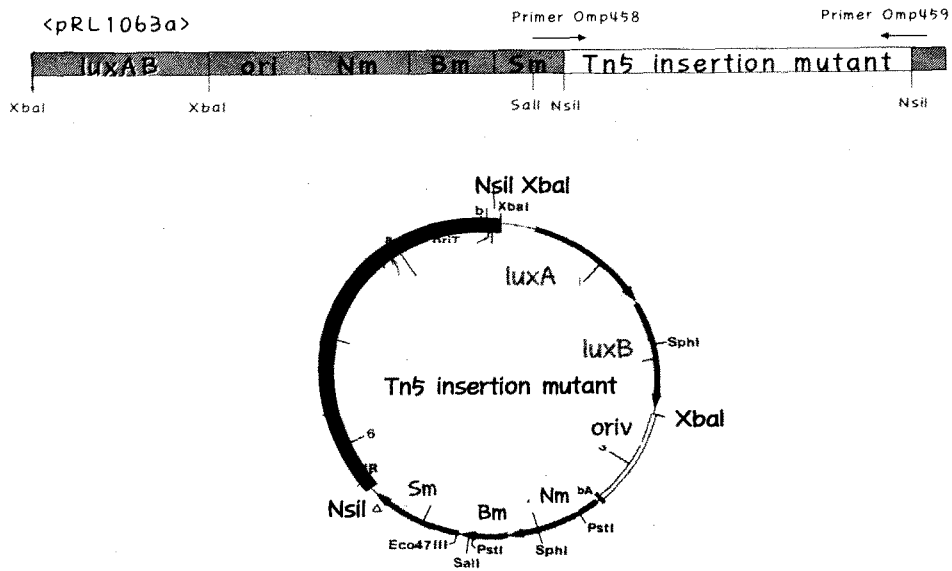


Fig. 1. Strategy of cloning and sequencing of Tn5 flanking sequence from *P. chlororaphis* O6 mutant.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 오이뿌리 분비액의 조성조사

오이 뿌리에서 추출한 오이 뿌리 분비액의 당과 유기산의 성분을 조사해 본 결과 유기산의 성분은 HPLC를 이용하여 측정한 결과, fumaric acid (0.01 mg/ml), malic acid (0.6 mg/ml), benzoic acid (9.939 mg/ml), oxalic acid (0.194 mg/ml)와 acetic acid (1.45 mg/ml)가 존재하였고, glucose (0.179 mg/ml)와 fructose (0.02 mg/ml)가 주요한 당 성분으로 측정되었으며, 전체 비율에서 유기산의 농도가 당의 농도보다 10배 이상의 농도로 존재하였다.

Table 2. Composition of cucumber root exudates

Organic acid	mg/ml	Sugar	mg/ml
Benzoic acid	9.939	Glucose	0.179
Acetic acid	1.45	Fructose	0.02
Oxalic acid	0.194		
Malic acid	0.6		
Fumaric acid	0.01		
Total	12.19		0.199

나. 뿌리 분비액을 이용하는데 이상이 생긴 돌연변이주들의 특성

1). 뿌리 분비액을 영양원으로 이용하여 이상이 생긴 돌연변이주 선발

*P. chlororaphis* O6 균주의 1000개의 Tn5 mutant 중에서 뿌리 분비액을 이용하는데 이상이 생긴 3개의 돌연변이주를 선발하였다. ELISA Reader를 이용하여 550nm에서 OD값을 측정하여 Wild-type인 *P. chlororaphis* O6 (OD550nm=0.165)와 비교하여 *P. chlororaphis* O6 H10은 OD550nm에서 0.321의 값으로 뿌리 분비액을 영양원으로 높은 OD값을 보였으며, *P. chlororaphis* O6 D1과 C2는 각각 0.092, 0.081의 값을 나타내었다 (data not shown).

본 실험에서 각 돌연변이주들의 특성을 규명하였다. *P. chlororaphis* O6와 선발된 Tn5 mutant들의 뿌리 분비액에서의 생육 정도를 비교해 본 결과 H10 mutant는 wild type과 유사한 생장율을 보이는 반면 C2는 wild-type에 비해 오이 뿌리 분비액에서의 생육이 현저히 감소하였다. D1의 초기 생육(6h)은 wild type과 비슷하였으나 12시간부터 wild type에 비해 균의 밀도가 감소하였다 (Fig. 2)

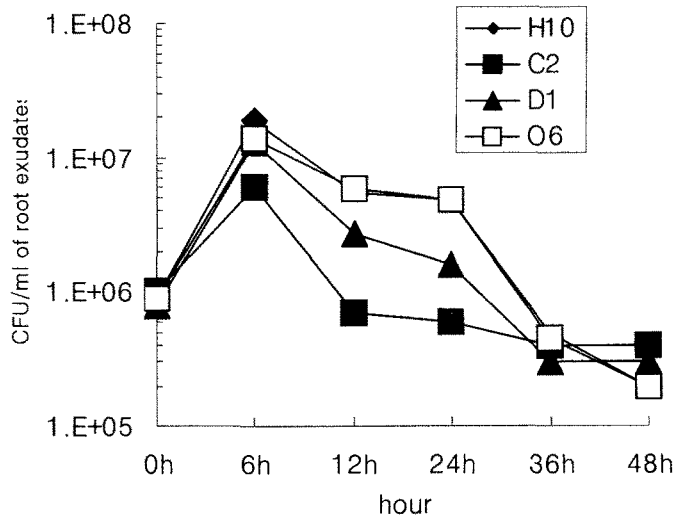


Fig. 2. Growth of *P. chlororaphis* O6 and Tn5 mutants in cucumber root exudates. O6 and Tn5 mutants were grown in LB until OD<sub>600nm</sub>=0.4. The cultures were harvested by centrifugation, resuspended in cucumber root exudates and adjusted to OD<sub>600nm</sub>=0.4. The bacteria were inoculated at a 1 : 100 dilution in fresh cucumber root exudates and incubated with shaking at 200 rpm at 28 °C. At defined times, growth of bacteria was determined by plating serial dilutions of root exudates on LB agar plates containing appropriate antibiotics.

## 2). Nutrient rich와 최소배지에서 mutant의 성장

*P. chlororaphis* O6와 Tn5 mutant들의 nutrient rich medium인 LB broth에서 생육을 비교해 본 결과, wild type과 선발된 돌연변이주들에서는 뚜렷한 생육의 차이를 보이지 않았다. 그러나 최소 배지에서의 생육정도는 차이가 있었다. 또한 오이 뿌리 분비액에서 추출되어진 유기산과 당을 기초로 하여 다양한 carbon source를 minimal 배지에 첨가하여 각각의 이용도를 비교해 본 결과, wild type과 H10과 D1은 모든 탄소원을 이용하였으나, C2 mutant는 탄소원을 첨가한 최소배지에서 생육을 하지 못하였다.

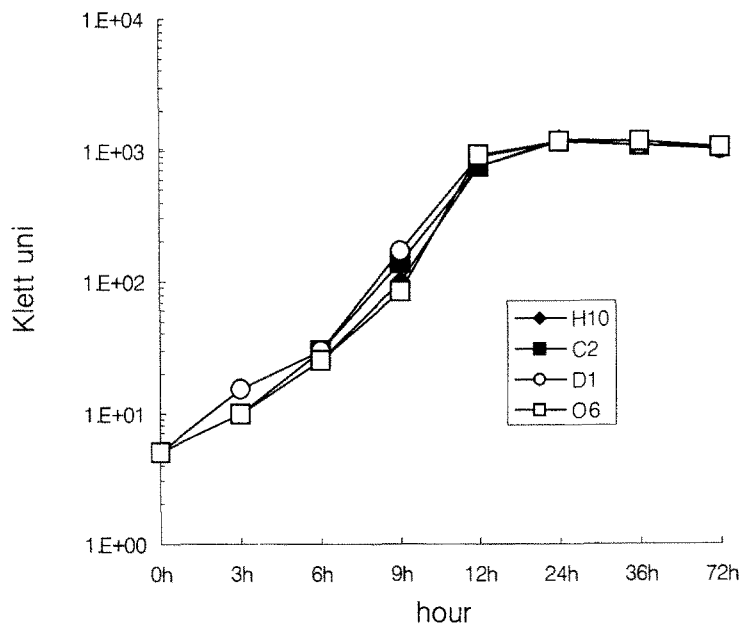


Fig. 3. Growth of *P. chlororaphis* O6 and Tn5 mutants in LB broth medium. O6 and Tn5 mutants were grown in LB until OD<sub>600nm</sub>=0.4. The bacteria were inoculated at a 1 : 100 dilution in LB broth medium and incubated with shaking at 200 rpm at 28 °C. At detail times, optical density of each culture was measured using spectrophotometer at 600nm.

Table 3. Growth of *P. chlororaphis* O6 and Tn5 mutants on minimal agar plates containing various carbon sources

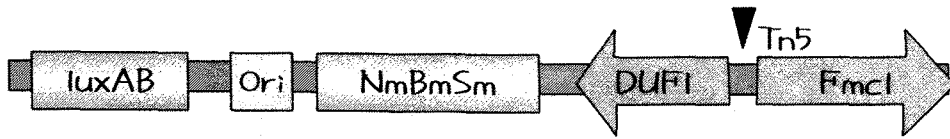
<i>P. chlororaphis</i> O6	Fumaric acid	Malic acid	Glucose	Benzoic acid	Citrate	Glucose
wild-type	+	+	+	+	+	+
H10	+	+	+	+	+	+
D1	+	+	+	+	+	+
C2	-	-	-	-	-	-

+ : Growth at wild type level, - : no growth

다. 돌연변이주의 Tn5-flanking region 분석

1). *P. chlororaphis* O6 H10의 염기서열 분석

Mutant H10의 Tn5-flanking sequence를 분석해 본 결과, Tn5는 전사 방향이 다른 두개의 putative open reading frame (ORF)의 promoter 부위의 유전자였으며, 한개의 ORF는 fumarate hydratase (*fumC1*)와 homology가 높았으며, 다른 한개의 ORF는 DUF1 유전자와 상동성이 높은 유전자였다 (Fig. 4). FumC는 해당과정에서 fumarate가 malate로 전환하는 과정에 관여하는 fumarate hydratase 유전자이다. DUF1은 two component system regulatory의 중요한 domain 중의 하나이다. Two component signal transduction system은 sensor histidine kinase와 response regulator를 포함한다. 이러한 two component system은 세균에서 여러 가지 유전자를 조절하는 global regulator로 알려져 있다. *Caulobacter crescentus*에서 DUF1은 swarmer-to-stalked-cell을 조절하는 protein으로 보고 되었으며 (Gregory and Hecht, 1995), *Acetobacter xylinum*에서 extracellular cellulose의 생합성을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Tal, et al. 1998).



ctttaagagtttccctaccctacaggccacttgccactttagtgggtgcgcaaaaaata  
 actatccattttgtccccgcccggcgccatcccgccccggcgcgccctaccgtcatg  
 cctggcggcatccccggctggcgtgtcccgggcatgcgactttggtttgactgcccggcg

▼ (TRANSPOSON 삽입부위)

gtgtgctggccccgagggcggtatactgcccgccttttagcgtcgcgccagtgtgt  
 ccggcgtgccttgaaaggtgtttgcaaccgaccgatgcaccaagctgcaagcaccttat

S.B                  FumC

taaatgttcccgcttttagaggagcgcgactcatgaccgtgatcaagcaagacgacctg  
 M F P S F R G A R L M T V I K Q D D L  
 attcagagcgttgccgacgcccctgcaattcatttctactaccaccccgtggatttcac  
 I Q S V A D A L Q F I S Y Y H P V D F I  
 caggcgtgcaacgaagcctacctgcggaagaatcgccagcggcccgtgactccatggcg  
 Q A M H E A Y L R E E S P A A R D S M A  
 cagatcctgatcaactcgcgcatgtgtgccaccggccaccgcccgatctgccaggacacc  
 Q I L I N S R M C A T G H R P I C Q D T  
 ggtatcgtcaccttatcgtacgcgtgggcatggacgtgcgctgggacggcgcgaccatg  
 G I V T V F V R V G M D V R W D G A T M  
 agcctggacgacatgatcaacgaaggcgtgcgtcgcgcttacaacctgccgaaaacgctc  
 S L D D M I N E G V R R A Y N L P E N V  
 ctgccccctcgatccttgccgacccggggcgctcgtaaaaacaccaaggacaacacc  
 L R A S I L A D P A G A R K N T K D N T  
 ccnggggtatttcnctattcnttcgttcccgggaacacnnggaattggcnttggcg  
 X G G I X L I X S F P G T X X K L X L A  
 gccaanggcngtggcttccagaacaaatcgaaatgggcntgcttaaccgcttgactt  
 A X G X G F Q N K F E X G X A

Fig. 4A. Nucleotide and deduced amino acid sequence of fumarate hydratase (*fumC1*) homology region in *P. chlororaphis* O6 H10

acctttcaaggcagcggacacactggcgcgacgctaaaaaggcggcagtataccgc  
 ▽(TRANSPOSON 삽입부위)  
 gcctcggggccaggcacacgcgccggcagtc aaaccaaagtgcgatgccggggacacgcc  
 agccgggggatgccgccaggcatgacggtaggcgcggccggggcgggatggcgcggggcg  
 gggacaaaaatgggatagttatTTTTTggcgacaccactaaagtggcaagtggcctgtag  
 Duf1  
 ggtaggaaactctttaagcccccttgcgatggtgagtcaacgattgaccataacgct  
 M V S Q R L T H N A  
 atccagagtcTTTTactcaagcgcttcggttcttgcggcgggtacctatggactggcggtta  
 I Q S L L L K R F V L A A G T Y G L A L  
 ctgctgctctggctggcgatTTTcagcggttactattcggcgccgctgcttccggcgtg  
 L L L W L A I F S G Y Y S A P L R S A L  
 atcgataccggcctggtggtgctgagccaggcggctgctctggctgttcgtgtccggg  
 I D T G L V V L S Q A V L L W L F V S G  
 cgcaacctgcgcttTcgcgaccgagcctgaccganatcagatcctcctggcatcggctg  
 R N L R F R D P S L T X I R S S W H R L  
 caaacctgnatgcttggcccactcnataccgcgcgcnacctttcctgggtgttctatt  
 Q T X M L G P P X Y R A R X L S W C S I  
 cncTgacctgttngtcnngcctggTccntTTTTTncngcncngggcctTTTTTggcgggg  
 X

Fig. 4B. Nucleotide and deduced amino acid sequence of Duf1 homology region in *P. chlororaphis* O6 H10

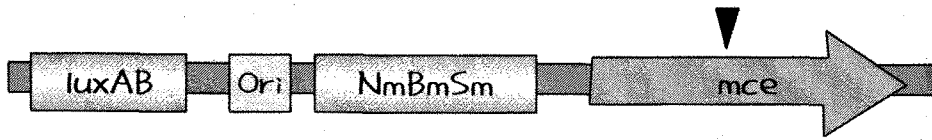


H10	1	MFPSFRGARLMTVIKQDDLQSVADALQFI	SYHPVDFIQAMHEAYLREESPAARDSMAQ	60
P. flu.	1	.....	.....	53(88%)
P. syr.	1	.....	.....	43(86%)
P. aer.	1	.A.....	.....	43(86%)
H10	61	ILINSRMCATGHRP	CQDTGIVTVFVRVGMVVRWDGATMSLDDMI	NEGVRRAYNLPENVL 120
P. flu.	54	.....	.....	113
P. syr.	44	.....	.....G.....	103
P. aer.	44	.....	.....V.....	103
H10	121	RASILADPAGARKNTKDNTXGGIXLIXSFP	GTXXKLXLAAXGXGFQNKFE	FXGAPALRSX 180
P. flu.	114	.....PAV.HY-SIV..	NTVEVDV..K.G.SE..	SKMAMLNPSD.I 172
P. syr.	104	.....PAV.HY-SIV..	NTVEVDV..K.G.SE..	SKMAMLNPSD.I 162
P. aer.	104	.....PAV.HY-SIV..	DKVEVDV..K.G.SE..	SKMAMLNPSD.I 162
H10	181	TGXKPFDHWPXVG	—CPPALFXIG	202
P. flu.	173	VDWV-LKTV.TM.AGW...	GMLG..	197
P. syr.	163	VDWV-LKTV.TM.AGW...	GMLG..	186
P. aer.	163	VDWV-LKTV.TM.AGW...	GMLG..	186

Fig. 5. Comparison of deduced amino acid sequence of the *P. chlororaphis* O6 H10 of Tn5 flanking sequence with amino acid sequences fumarate hydratase from other bacterium.

## 2). D1 mutant의 Tn5 - flanking sequence 분석

Tn5는 D1 mutant에서 Tn5는 putative open reading frame에 삽입되었다. Tn5가 삽입된 ORF는 *Mycobacterium tuberculosis* mammalian cell entry operon (*mce*) domain부분과 높은 상동성을 나타내어 MCE domain에 Tn5가 삽입되어 있음을 확인하였다. 87%로 *Pseudomonas fluorescens*와 유사성이 높았다 (Fig. 6, 7). *Mce* 유전자는 *M. tuberculosis* mammalian cell entry operons (*mce1*, *mce2*, *mce3* and *mce4*)으로 이루어져 있으며, 그 function에 대해서 정확하게 알려진 바는 없으나, colonization에 관여하며 mammalian cell에서 병원균에 들어가고 생존하기 위해 중요한 protein으로 작용한다고 보고 되고있다(Cole and Barrell, 1998). 따라서 *P. chlororaphis* O6의 *mce* 유전자가 오이 뿌리 분비액 이용과 아마도 식물 정착 능력에도 관여하는 것으로 사료되며, *M. tuberculosis*에 그 기능이 밝혀지지 않은 *mce* 유전자의 기능을 밝히는 데도 중요한 재료가 될 것으로 사료된다.



```

gngcgcaaacatagcggttctggaacgccagcggcatcagcatcgacgccaacctgtcc
X R K H T R F W N A S G I S I D A N L S
ggtgtgaaagtacgtagcgaatccctggccagcatcgtcgccggcggtatcgccctcgct
G V K V R S E S L A S I V A G G I A F A
accccagagaatcgccgagacagcccgccgaccgaccgagcctgccgttccgtctctac
T P E N R R D S P P T D P S L P F R L Y
gaagacttcgacgcggcgaggcgggcatccgggtcaaggtcaagctgagtgacttcgaa
E D F D A A Q A G I R V K V K L S D F E
gggctccaggcaggccgcacgccagtcagtgtacaaggggatccaggtcggtaacctgaag
G L Q A G R T P V M Y K G I Q V G N L K
gccctcaaggtcgaccccgatctttccagtgcgacggcggagctgaccctggacccatg
A L K V D P D L S S A T A E L T L D P L
gccgaggattacctggtgcaaggcaccagttctgggtggtcaagccttcgatttccctg
A E D Y L V Q G T Q F W V V K P S I S L

```

g c g g g t a t c a c c g g c c t g g a a g c c t t g g t g a a g g g c a a c t a c a t c g c g g t g c g c c c g g t  
 A G I T G L E A L V K G N Y I A V R P G  
 g a c a a g g g c g g c g c c c c g c a a c g c g a a t t c g a g g c g c g g c c c a a g g c g c c c g c t g g a c  
 D K G G A P Q R E F E A R P K A P P L D  
 c t g c g c t c c c c t g g c c t g c a c c t g g t g c t g t t a c t g a a a c c t c g g t t c g c t g g a g g t g  
 L R S P G L H L V L F T E N L G S L E V

▽(transposon 삽입부위)

g g c a g c c c g a t t c t g t a c a a g c a g g t c a a g g t c g g c t c g g t g c a g a g c t a c c a a t t c t c g  
 G S P I L Y K Q V K V G S V Q S Y Q F S  
 c g g a c c c g c a a g c a g t t g g t g a t c g g c g t g c a c a t c g a g a g g a a t a c g a a g g g c t g g t g  
 R T R K Q L V I G V H I E K E Y E G L V  
 a a c g g t t c g a c g c g c t t c t g g a a c c c a g c g g c g t c a c c t t g a c c g g t g g c c t g a c c g g c  
 N G S T R F W N A S G V T L T G G L T G  
 g g c a t c c a g g t c a a g a g c g a g t c g c t g c a a a g c c t g a t g g c c g g c g g t a t c g c c t t c g a c  
 G I Q V K S E S L Q S L M A G G I A F D  
 a c g c c g g a a c c c a a t g t g c c g c t g a a a a g c g t a t c c c g c g t t t c c g c c t g t a t g c c g a c  
 T P E P N V P L K K R I P R F R L Y A D  
 a a g g a g c a g g c g a c g c a g a a a g g c a c g c t g a t c a g c a t c a a g g t c g a t c g c g c c g a t g g c  
 K E Q A T Q K G T L I S I K V D R A D G  
 c t g c g t t c g g g c a c g c c a t a c c g c t t c a a g g g c c t g g a t g t c g g c a a g g t c g a a a g c g t t  
 L R S G T P I R F K G L D V G K V E S V  
 g a c c t g a g c g g g a c c t g c a g t c g g t g c t g c t a a g g c c c g g a t c a c c g a a g t g c c g g a g  
 D L S G D L Q S V L L K A R I T E V P E  
 c g t a t c g c g c g g g t t g g c a g c c a g t t c t g g g t g g t c a a g c c g g a g c t t g g g t g a t c a a g  
 R I A R V G S Q F W V V K P E L G L I K  
 a c c g g c a a c c t g g a a a c c c t g g t g a c c g g g c a g t a c a t c g a a g t g c a g c c g g c g g c g a a g  
 T G N L E T L V T G Q Y I E V Q P A A K  
 aa

Fig. 6. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the Tn5 flanking region in *P. chlororaphis* O6 D1

D1 1 RKHTRFWNASGISIDANLSGVKVRSESLASIVAGGIAFATPENRRDPSPTDPSLPFRLYE 60  
P.flu. 213 .....K..... 272(87%)  
A.vin. 215 .....TV..G.G...FHT.....K.....R.....D 274(69%)

D1 61 DFDAAQAGIRVKVKSDFEGLQAGRTPVMYKGIQVGNLKALKVDPDLSSAAELTDPLAE 120  
P.flu. 273 .....A.....I..... 332  
A.vin. 275 N....T..K.MLE.....V.....I..T.QIE.G..R.M..... 334

D1 121 DYLVQGTQFWVVKPSISLAGITGLEALVKGNVI AVRPGDKGGAPQREFEARPKAPPLDLR 180  
P.flu. 333 .....T..... 392  
A.vin. 335 ..F..E.AD.....G.V.....GM...E..ASVR.S.V..S...M.. 394

D1 181 SPGLHLVLFTEENLGSLEVGSPILYKQVKVGSVQSYQFSRTRKQLVIGVHIEKEYEGLVNG 240  
P.flu. 393 A.....DT...ID.....K.....N...A 452  
A.vin. 395 A.....TSDT...DI..V..R.I.....F.L..N.RRVLL....P..AS...S 454

D1 241 STRFWNASXXXXXXXXXXIQVKSSELQSLMAGGIAFDTPPEPNVPLK-KRIPRFRLYADK 300  
P.flu. 453 .....V.GVTLTGGLTGG.....T.....E..QAKA..Q-.....F.SH 512  
A.vin. 455 .....-GVTLGGGLSG.E.....T.L.....E..D.EASANTR...YA.H..R 514

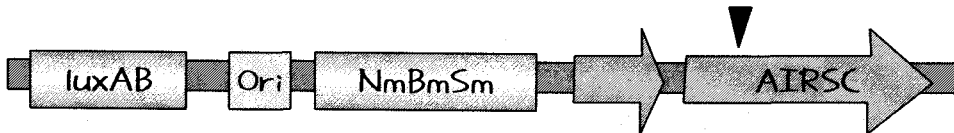
D1 301 EQATQKGTL-ISIKVDRADGLRSGTPIRFKGLDVGVESVDLSGDLQSVLLKARITEVPER 360  
P.flu. 513 DE.N...AV-VT.....V.....I.....TD.....I.T.....K 572  
A.vin. 515 .T.L.A.LE-LQ.R..SG...KA....Y.....G.E..D.....R...QAA.. 574

D1 361 IARVGSQFWVVKPELGLIKTGNLET 385  
P.flu. 573 .....S.... 597  
A.vin. 575 .....R.....MR.A..D. 599

Fig. 7. Comparison of deduced amino acid sequence of the *P. chlororaphis* O6 D1 Tn5 flanking sequence with amino acid sequences of *mce* from other bacteria.

### 3). C2 mutant의 Tn5 flanking sequence 분석

C2 mutant의 flanking sequence는 purine 생합성에 관여하는 AIR synthase를 암호화하고 있는 *purM*과 높은 homology를 보였다. Sequencing 결과 full length open reading frame을 가지고 있었으며 352개의 amino acid로 구성된 유전자로 pI 4.99와 약 37kDa subunit으로 구성되어 있었다 (Fig. 8 and 9). AGGA 리보솜 binding site를 가지고 있었고 Tn5가 삽입된 부분은 174번째 amino acid에 삽입되어 *purM*이 불활성된 것으로 사료된다. AIR synthase는 purine 생합성에서 중요한 product인 Formyl glycinamide ribonucleotide에서 5-Aminoimidazole ribonucleotide를 생성하는데 관여하는 유전자이다. AIR synthase는 AIRS와 AIRSC의 두가지 subunit으로 이루어져 있으며, N-terminal 부분에는 ATP-binding site가 있으며, C-terminal domain은 sulphate binding site가 존재한다. 다른 ORF이 downstream쪽의 *purM*에 존재하였다. Partial deduced amino acid이기는 하지만 AIR synthase을 암호화하고 있는 *purN* 유전자와 상동성이 높은 ORF가 존재하는 것을 확인하였다. *P. chlororaphis* O6에는 *purM*과 *purN*이 하나의 operon으로 존재하는 것으로 생각된다. 비록 C3 mutant에서 *purM*에 Tn5가 삽입되었지만 transposon의 polar effect에 의해 *purN* 유전자의 발현도 이루어지지 않는 것으로 추정된다.



```

ctcaagcttgataaaatcgcgcgcccttcgcagaccggcaacagccgggggtcgctgaat
gattgCGTggcatTgCCGCCGcgactgtttcaatggcctccctggactcggtcgatacc
cctgaatccccctaaaggcctggatcatgagcaagcaaccctccctgagctacaagac
      purM   R.B           M S K Q P S L S Y K D
gccggtgtagacatcgagccgggtgaagcatTggtcgaacgcatcaagagcgtcgccaag
A G V D I D A G E A L V E R I K S V A K
cgactgCGGCCCGgaagtcatgggCGGcctgggCGgtttCGGCGcccttgcgaaatc
R T A R P E V M G G L G G F G A L C E I
cggccggctacaagcagccggtactggtctcggcaccgacggcgtggccaccaagctg
P A G Y K Q P V L V S G T D G V G T K L
cgctggcactgaacctgaacaagcatgacagcatcgccaggacctggtgcgatgtgc
R L A L N L N K H D S I G Q D L V A M C
gtcaacgacctggtggtctgCGgtgccgagccgctgttcttctcgactactcgccacc
  
```

V N D L V V C G A E P L F F L D Y Y A T  
 ggcaaactgaacgtcgacgtcgccgccaccgtgggtaccggcatcggtgccggctgcgaa  
 G K L N V D V A A T V V T G I G A G C E  
 ctggctggctgctccctgggtggcggtgaaaccgctgaaatgccaggcatgtacgaaggc  
 L A G C S L V G G E T A E M P G M Y E G  
 gaagactacgacctggccggcttctgctcgcgctgggtggaaaaagccgaaatcatcgac  
 E D Y D L A G F C V G V V E K A E I I D

▽ (Transposon inserted site)

ggctccaaggttgcaccggcgacgccctgctggccctgccgtcttccggctccgcactcc  
 G S K V A T G D A L L A L P S S G P H S  
 aacggctactcgctgatccgcaagatcatcgaagtctccggcggcagacatcgaaacctc  
 N G Y S L I R K I I E V S G A D I E T V  
 cagctcgacggcaagccgttgaccgaactgctgatggccccgaccgcatctacgtcaag  
 Q L D G K P L T E L L M A P T R I Y V K  
 ccactgctcaagctgatcaaggacactggcggcgtcaaagccatggcccacatcactggc  
 P L L K L I K D T G A V K A M A H I T G  
 ggcggcctgctggacaacatcccacgcttctgccaaaaggcggccaggccgtggtcgac  
 G G L L D N I P R V L P K G A Q A V V D  
 gtggccagctggcagcgtccggcggtattcgactggctgcaagagaagggaatgtcgaa  
 V A S W Q R P A V F D W L Q E K G N V E  
 gaacacgaaatgcaccgctgctgaactgcggcgtggcagatggtgatctgctggctcag  
 E H E M H R V L N C G V G M V I C V A Q  
 gagcacgttgaaagcgcctgaacgtcctgcggaagccggcgaacagccttgggtcatt  
 E H V E S A L N V L R E A G E Q P W V I  
 ggtcagatcgctagcggccgaaggcgtgcccaggctcgagctgaaaaacctcaaggca  
 G Q I A S A A E G A A Q V E L K N L K A

purN

cattgatgcaagagccgatgccagccacctgtgatgtagtggctgtgtgccgtaccg  
 H - r.b. M P A T C D V V V L L S G T  
 gcagcaacttgcaggccctgatcgacagtaccggcccgacgacagcccggt  
 G S N L Q A L I D S T R P D D S P

Fig. 8. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *P. chlororaphis* O6 C2 Tn5 flanking sequence

C2 purM	1	MSKQPSLSYKDAGVDIDAGEALVERIKSVAKRTARPEVMGGLGGFGALCEIPAGYKQPVL	60
<i>P. fluorescens</i>	1	.....	60(97%)
<i>P. syringae</i>	1	.....K.....	60(94%)
<i>P. aeruginosa</i>	3	.....G.....	61(87%)
C2 purM	61	VSGTDGVGTKLRLLALNLNKHDSIGQDLVAMCVNDLVVCGAEPLFFLDYYATGKLNVDVAA	120
<i>P. fluorescens</i>	61	.....	120
<i>P. syringae</i>	61	.....T..I.....T..	120
<i>P. aeruginosa</i>	62	.....	121
C2 purM	121	TVVTGIGAGCELAGCSLVGGETAEMPGMYEGEDYDLAGFCVGVVEKAEIIDGSKVATGDA	180
<i>P. fluorescens</i>	121	.....	180
<i>P. syringae</i>	121	Q.....A...	180
<i>P. aeruginosa</i>	122	.....R.QA...	181
C2 purM	181	LLALPSSGPHSNGYSLIRKIIIEVSGAD IETVQLDGKPLTELLMAPTRIYVKPLLKLIKDT	240
<i>P. fluorescens</i>	181	..I.....	240
<i>P. syringae</i>	181	.....A.....NI.....E.	240
<i>P. aeruginosa</i>	182	..I.....AQ.....AD.....Q...Q.	241
C2 purM	241	GAVKAMAHI TGGGLLDNIPRVLPGGAQAVVDVASWQRPVAVFDWLQEKGNVVEEHMHRVLN	300
<i>P. fluorescens</i>	241	.....N.....D.T.....	300
<i>P. syringae</i>	241	.....Q.....QQ...A.N.....	300
<i>P. aeruginosa</i>	242	.....DN...I...N.....Q...D.T.....	301
C2 purM	301	CGVGMVICVAQEHVESALNVLREAGEQPWVIGQIASAAEGAAQVELKNLKAH	352
<i>P. fluorescens</i>	301	.....V...T..D.....A.....	352
<i>P. syringae</i>	301	.....A..K...D.....	352
<i>P. aeruginosa</i>	302	.....SDA.K..E...A.....Q..R.ETCGAD.ER.V.N...N.	353

Fig. 9. Comparison of deduced amino acid sequence of the *P. chlororaphis* O6 C2 Tn5 flanking sequence with amino acid sequences of *purM* encoding from other bacteria.

라. C2 mutant의 오이 갈반병에 대한 induced systemic resistance능력

Wild-type인 *P. chlororaphis* O6와 purine 생합성이 저해된 C2를 오이 뿌리에 접종한 후, 오이 갈반병을 유발하는 *Corynespora cassiicola* CM2000-1을 접종하여 병 저항성 유도 여부에 관해 실험을 실시하였다. Wild-type인 *P. chlororaphis* O6는 생물적 방제균으로서 병저항성 능력을 가지고 있어 *Corynespora cassiicola* CM2000-1을 접종한 후 갈반병 병반수를 조사하였을 때, 병반수가 적게 발생하였으나, *P. chlororaphis* O6 C2는 병 저항성 유도 능력이 상실되어 병원균만을 처리한 control과 비슷하게 병반수가 많이 발생하였다 (Fig. 10).

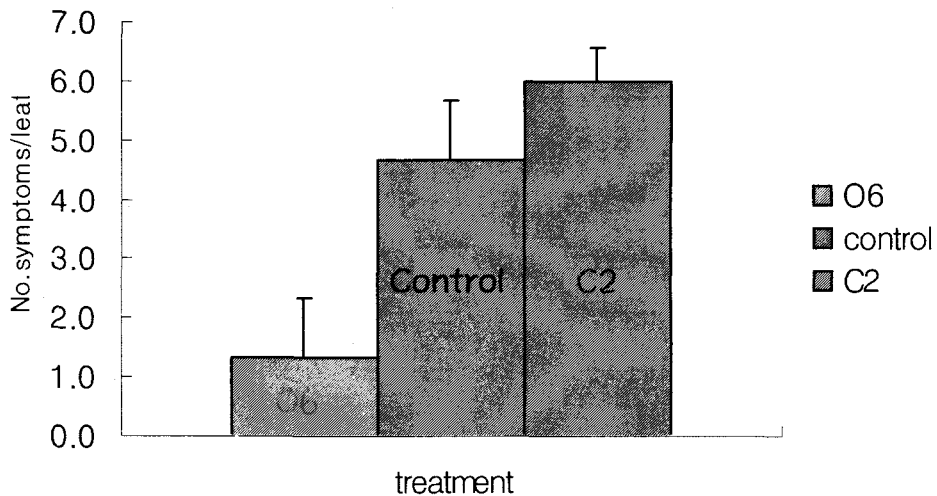


Fig. 10. Induced systemic resistance ability of *P. chlororaphis* O6 and C2 mutant. Cucumber plant with completely developed third leaves were spray-inoculated with conidial suspension( $10^5$  spores/ml) of *Corynespora cassiicola* CM2000-1 and incubated in a mist chamber at 30 °C. Symptoms on inoculated leaves were observed 3 days after incubation.



마. *P. chlororaphis* O6 mutant C2의 식물뿌리정착 능력

*P. chlororaphis* O6와 C2돌연변이주를 오이 종자에 seed coating하여 colony forming unit/g of root을 조사한 결과, 초기 접종 농도는  $4 \times 10^5$  CFU/seed으로 동일하였으나, 5일 후에는 *P. chlororaphis* O6는  $6 \times 10^6$  CFU/g of root으로 증가하였으나, *P. chlororaphis* O6 C2는  $5 \times 10^5$  CFU/g of root으로 초기에 접종한 양과 변화 없이 colonization이 되지 않았다. 10일 후에는 *P. chlororaphis* O6는  $3.4 \times 10^6$  CFU/g of root으로, C2 돌연변이주는  $2 \times 10^5$  CFU/g of root이었다. 이러한 결과로 보아 *P. chlororaphis* O6 purine 생합성 능력이 식물 뿌리에서 생육하는데 필수적인 유전자임을 알 수 있었고, 뿌리 정착 능력이 유도 저항성에 필수적인 요인임을 알았다.

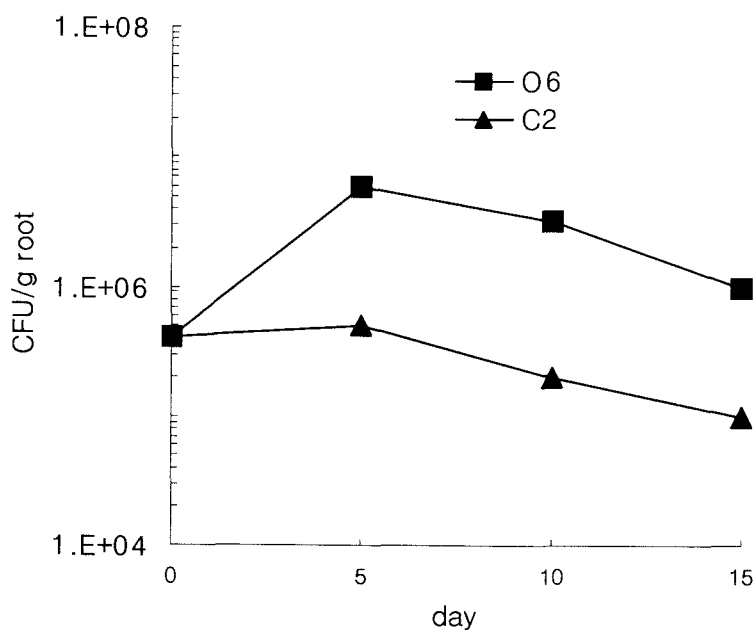


Fig. 11. Colonization ability of *P. chlororaphis* O6 and C2 mutant on cucumber root. *P. chlororaphis* O6 and C2 were grown in LB until OD<sub>600nm</sub>=0.4. The bacteria were inoculated at a cucumber plant and incubated at 28 °C. At defined times, growth of bacteria was determined by plating serial dilutions of sterilized water on LB agar plates containing appropriate antibiotics.

식물뿌리에 서식하는 식물근권 세균(Rhizobacteria)을 이용하여 식물 병을 방제하는 생물적 방제에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 그러나 이러한 고기능 rhizobacteria를 실제 포장에서 사용하고자 하였을 때 가장 문제시 되는 점 중의 하나가 미생물의 식물 뿌리에 정착하는 능력이다. 지금까지 연구된 바에 의하면 일반적으로 10<sup>5</sup> colony forming unit/g of root 농도 이상의 rhizobacteria가 뿌리에 존재하였을 때 식물병 저항성이 유도되고 그 이하인 경우에는 저항성이 유도되지 않아 병 저항성을 유도하는 rhizobacteria의 식물정착능력이 아주 중요한 요인 중의 하나이다. 그래서 식물 뿌리 정착에 관련된 연구는 rhizobacteria를 실제 포장에서 사용하고 그들의 능력을 증가 시키는데 중요한 정보가 될 것이다.

오이 식물체의 뿌리에서는 다양한 유기산과 당이 분비된다. 분비액에서 유기산이 당 농도에 비해 10배 이상으로 존재함을 확인하였다. 즉 식물 뿌리에 서식하는 미생물들이 주요한 carbon source로 fumaric acid, malic acid, benzoic acid, oxalic acid와 acetic acid와 같은 유기산을 주로 이용하는 것으로 생각되어진다. 일반적으로 Pseudomonas속들의 세균들은 유기산을 호기 탄소원으로 사용하며 거의 대부분의 식물병원 진균들은 당을 주 탄소원으로 사용하는 것으로 알려져 있다. 그래서 실제 포장에서 rhizobacteria를 처리할 경우 유기산을 함께 살포함으로써 rhizobacteria의 정착에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

식물 뿌리 분비액 이용에 관한 유전자를 찾기 위해 식물 뿌리 분비액을 영양원으로 하여 식물 뿌리 분비액을 이용하는데 이상이 생긴 3개의 돌연변이주를 선발하였다. 이들의 조성에 따라 rhizobacteria의 뿌리 정착에 어떠한 영향을 주는 지도 밝힘으로서 rhizobacteria를 실제 포장에 사용할 때 중요한 정보를 제공할 수 있을 것이다.

돌연변이 중의 하나인 *P. chlororaphis* O6 H10은 뿌리 분비액을 영양원으로 하여 wild type strain O6 보다 더 빠르게 자라는 것을 관찰하였다. *P. chlororaphis* O6 H10은 *fmc1*와 DUF1을 조절하는 promoter 부위에 Tn5가 삽입되었다. Fumarate hydratase는 해당과정에서 fumarate가 malate로 전환되는 과정에 관여한다. DUF1은 two component system regulatory protein으로 sensor histidin kinase와 response regulator를 포함한다. DUF1에 의해 조절되어지는 negative regulatory protein에 이상이 생겨 뿌리 분비액을 더 빨리 이용하는 것으로 생각되어진다.

*P. chlororaphis* O6 D1은 뿌리 분비액을 영양원으로 하여 느리게 성장하는 mutant이다. strain D1은 mycobacterial cell entry(*mce*) 유전자 부분에

Tn5가 삽입되었다. Mce는 colonization에 관여하며, 세포 안에서 생존하기 위한 중요한 protein으로 작용한다. 이 *mce* 유전자에 관한 정확한 기능은 밝혀지지 않았지만, 식물 뿌리 분비액에서 생장이 느려지는 것으로 보다 뿌리 분비액을 영양원으로 이용하는데 관여하는 유전자일 것으로 사료된다.

*P. chlororaphis* O6 C2는 *purM* 유전자 부분에 Tn5가 삽입되어 뿌리 분비액을 전혀 이용하지 못하였다. PurM은 purine 생합성 과정에서 formyl glycinamide ribonucleotide에서 5-aminoimidazole ribonucleotide를 생성하는데 관여하는 유전자이다 (Fig. 1.) *P. chlororaphis* O6 C2는 *purM* 유전자가 손상이 됨에 따라 purine이 생합성 되지 못하여 뿌리 분비액에서 자라지 못하는 것으로 사료된다. 위와 같은 결과로 보아 purine은 rhizobacteria가 뿌리 분비액을 영양원으로 이용하고 colonization에 관여하는 중요한 산물이라고 생각되어진다.

Tn5 삽입 부위를 클로닝하고 뿌리 분비액 이용에 관련된 유전자를 클로닝하여 각각의 유전자 단편들은 돌연변이주에 triparental mating에 의해 전이시켜 그들 유전자가 Tn5 돌연변이주들의 손상된 뿌리 분비액 이용 능력을 complementation되는지 확인하는 실험을 수행할 예정이다. 또한 northern hybridization에 의해 이들 유전자의 발현조절 양상을 확인할 예정이다.

위의 실험결과들은 식물의 뿌리에 정착하는데 rhizobacteria에게 어떤 물질들이 영양원으로 필요하며, rhizobacteria가 식물의 성장을 촉진하고 병 저항성을 유도하는데 어떤 영양원들이 요구되는지 등을 밝힐 것이다. 이러한 결과를 기초로 해서 rhizobacteria를 오이의 뿌리에 접종할 때 이러한 물질들을 같이 주입함으로써 rhizobacteria의 식물 정착 능력을 향상시킬 뿐만 아니라 유용형질들의 발현을 향상시킬 수 있을 것이다.

## 제 9 절 Transcriptional regulation and mutational analysis of a *dctA* gene encoding an organic acid transporter protein from *Pseudomonas chlororaphis* O6

### 1. Introduction

Biocontrol conferred by root-associated microbes is attractive as an alternative and supplemental approach to plant disease control. Certain root-colonizing pseudomonads display biocontrol potential through a diversity of mechanisms (O'Sullivan and O'Gara 1992; Whipps, 2001). The aggressive root colonizer *Pseudomonas chlororaphis* (*Pc*) O6 produces phenazines with antifungal activity (Tucker et al., 1995) and stimulates plant defense gene expression (Spencer et al., 2003). Although colonization of roots by this bacterium is vital for successful biocontrol, little is known about the preferences in *Pc*O6 for nutrients during root colonization (Lugtenberg and Dekkers, 1999). Root exudates contain a complex of sugars, dicarboxylic acids and other compounds (Lugtenberg et al., 2001; Philips and Streit, 1995).

During analysis of the genes adjacent to the *gacS* gene, encoding a global regulator (Spencer et al., 2003), in an 11kb *Bam*HI-fragment from *Pc*O6, we detected a sequence with homology to C4-dicarboxylate transporter genes from other microbes. In the nitrogen-fixing root colonist, *Rhizobium leguminosarum* (Giblin et al., 1995; Yurgel et al., 2000), three genes encode a complex conditioning a C4-dicarboxylate transport (Dct) system. An H<sup>+</sup>/dicarboxylate symporter protein is encoded by *dctA*, whereas *dctB* and *dctD* genes encode a two-component sensor-kinase and a response-regulator that regulate transcription of *dctA* in the presence of dicarboxylates. Mutations in any of these three *dct* genes eliminate transport and growth on C4-dicarboxylates. Thus, the *dctA* mutants of *Rhizobium* do not grow on malate, fumarate, and succinate as sole carbon source although growth is normal on sugars (Giblin et al., 1995; Yurgel et

al., 2000). The transport of these C4-carboxylic acids is essential for the process of nitrogen fixation because this property is lost in the *dctA* mutants.

In this work, we describe the cloning of the gene from *PcO6* with homology to the *dctA* genes in *Rhizobium* and other pseudomonads. We investigated how transcript accumulation of the *dctA* gene in *PcO6* was regulated by organic acids and glucose, in the presence and absence of C4-dicarboxylic acids. To examine the influence of this transporter on growth we generated a mutation in *dctA* in *PcO6* to study the utilization of different carbon sources.

## 2. Materials and Methods.

### 2.1. Bacterial strains and growth conditions.

The *PcO6* strain, isolated from the roots of wheat grown in Logan Utah (Tucker et al., 1995), was stored in 15% glycerol at -80 °C. King's medium B (King et al., 1954) or M9 minimal medium (Sambrook et al., 1989) with designated carbon sources (0.2% glucose, fructose, sucrose, inositol, citrate, succinate, malate, fumarate, benzoic acid, and acetate) was used for growth on medium solidified with agar or in liquid medium, with shaking at 100 rpm at 26 °C. Media were amended with the appropriate antibiotics: ampicillin (50 µg/ml), tetracycline (20 µg/ml) or kanamycin (50 µg/ml).

### 2.2. Cloning of the *dctA* gene.

The *dctA* gene of *PcO6* was located adjacent to the *gacS* gene (GenBank accession number *gacS*, AF192795) on an 11kb *Bam*HI-cosmid clone, pL21R (Fig. 1). A 4.5kb *Xba*I/*Bam*HI fragment from pL21R was ligated into pUC19 to yield pL21D. Clone pL21D and its subclones were used to determine the sequence of the *dctA* gene. The GenBank accession number for the nucleotide and deduced amino acid sequences of the *dctA* gene of *PcO6* is AY210439.

### 2.3. DNA manipulation.

DNA manipulations for cloning and subcloning were carried out as described in Sambrook et al. (1989) and Ausubel et al. (1989). Other gene manipulations including isolation of genomic and plasmid DNA, sequencing and DNA sequence analysis were done as described previously (Kim et al., 1999). Nucleotide (nt) and deduced amino acid (aa) sequences were analyzed using the University of Wisconsin Genetic Computer Group (GCG) packages and NCBI Blast program. Hydrophobicity and transmembrane domains of deduced aa sequences were analyzed by the Soshi program (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp>). The promoter sequence of *dctA* was analyzed by using the web-based Promscan software designed for detection of bacterial sigma factor-54 binding sites ([www.promscan.uklinux.net](http://www.promscan.uklinux.net)). The phylogenetic relationship between *dctA* genes from different microbes was determined using a 1,300 bp sequence and the CLUSTAL-W program of WORKBENCH. For Southern analysis, total genomic DNA from *PcO6* and *dctA* mutants was digested with *Bam*HI, and the fragments were separated by electrophoresis, before transfer to a positively charged nylon membrane. The membrane was probed with a 1.8kb *Kpn*I/*Bam*HI fragment from pL21D, containing the *dctA* open reading frame (ORF), labeled by using a random DNA dig-labeling kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).

### 2.4. Effect of growth phase and carbon source on expression of the *dctA* gene.

*PcO6* cells were cultured in minimal medium containing 0.2% glucose and/or 0.2% various organic acids. Cells were harvested at OD<sub>600nm</sub>=0.1 for early-log phase cells, at 0.7 for mid-log phase cells and at 1.5 for late-log phase cells. Total RNA, isolated from these cells according to Ausubel et al. (1989), was separated on 2% formaldehyde agarose gels, and blotted onto positively-charged nylon membranes (Kim et al., 1999). Northern and Southern hybridizations were performed using the user's guide of the nonradioactive Genius system (Roche Molecular

Biochemicals, Mannheim, Germany). Chemiluminescent immunodetection was performed at room temperature using Kodak X-ray film.

RT-PCR analysis of total RNA isolated from *PcO6* cells was performed to confirm expression of the *dctA* gene. Total RNA was isolated using the Trizol<sup>TM</sup> method following the user's manual (GIBCO BRL, Rockville, MD, USA). RT-PCR was performed using the QuantiTect SYBR Green reverse transcription-PCR kit (Quiagen Cat. No. 204243). Two specific primers for the *dctA* gene, forward (5'-TTC TGT ACC GTC GTC AGT GG-3') and reverse (5'-CAT CCA GGG TGG ACA CAT C-3') were added to the reaction mixture. Specific primers for the 16S rRNA gene, forward (5'-TGG CTC AGA ACG AAC CCT GGC GGC-3') and reverse (5'-CCC ACT GCC TCC CGT AAG GA-3') were used for an internal standard. A 25 $\mu$ l mixture was incubated at 50 °C for 30 min for reverse transcription, followed by RT-PCR. A Rotor-Gene 2000 Real Time Cycler machine was used for 35 cycles with denaturation at 94 °C for 15 seconds, annealing at 55 °C for 30 seconds, and extension at 72 °C for 30 seconds. Software generated by Corbett Research Inc., Australia, was used in the analysis of the PCR products.

## 2.5. Generation of the *dctA* mutant.

The *dctA* gene in plasmid pL21D was disrupted by the insertion of a 0.9 kb *KpnI* fragment containing a kanamycin resistance gene from the plasmid pRL648 (Elhai and Wolk, 1988) into the unique *KpnI* site within the *dctA* ORF. The chromosomal *dctA* gene in *PcO6* was exchanged for the disrupted version as previously described (Miller et al., 1997) using the exchange vector pCPP54 (Tc<sup>R</sup>). Three putative mutants were selected based on their resistance to kanamycin and sensitivity to tetracycline, on plate medium containing 5% sucrose. Southern analysis, using DNA extracted by the standard cetyltrimethylammonium bromide method (Ausubel et al., 1989) and the dig-labeled *dctA* gene as a probe, was used to confirm disruption of the *dctA* gene.

## 2.6. Growth studies on the *dctA* mutant and wild-type.

Growth of the *dctA* mutant was compared with that of the wild-type in M9 minimal medium containing 0.2% sugar or organic acid as sole carbon source. Growth was determined in liquid culture by assessment of optical density at 600nm or by counting colony forming units/ml on King's medium B agar plates.

## 3. Results.

### 3.1. The *dctA* gene of PcO6.

A *dctA*-like gene was observed in the PcO6 genomic fragment pL21D (Fig. 1) separated from *gacS* by a predicted ORF encoding an unknown function, *orfX*. A 1kb sequence adjacent to the *dctA*-like sequence (Fig. 1) had an incomplete predicted ORF but because the partial sequence had 6070% identity with putative *dctB*-like genes encoding transcriptional regulators in *Pseudomonas fluorescens* PfO-1 and *P. aeruginosa* PAO1 we designate this sequence as *dctB* (Fig. 1).

The *dctA*-like gene had a predicted 1,332 bp ORF, with a deduced aa sequence of 444 residues, corresponding to a subunit molecular weight of about 47 kD and pI 8.2. The nucleotide sequence of the *dctA* gene from PcO6 was similar to other *dctA* genes in other plant associated Gram-negative bacteria and *E. coli* (Fig. 2). At the amino acid level the deduced DctA protein had 90% identity with *P. syringae*pv. tomato DC3000 and pv. *syringae* B728a, 88% identity with *P. fluorescens* PfO-1 and 86% identity with *P. putida* KT2440 compared with lesser 60% identity for DctA from *Agrobacterium tumefaciens*. The deduced amino acid sequences for the PcO6 DctA had at the N terminus, between aa 35 and 54, a 100% match, and at the C terminus, between 291 to 318, a 28/29 match with DctA proteins characterized as functional H<sup>+</sup>/C<sub>4</sub><sup>-</sup>-dicarboxylate symporters (Janausch et al., 2002).



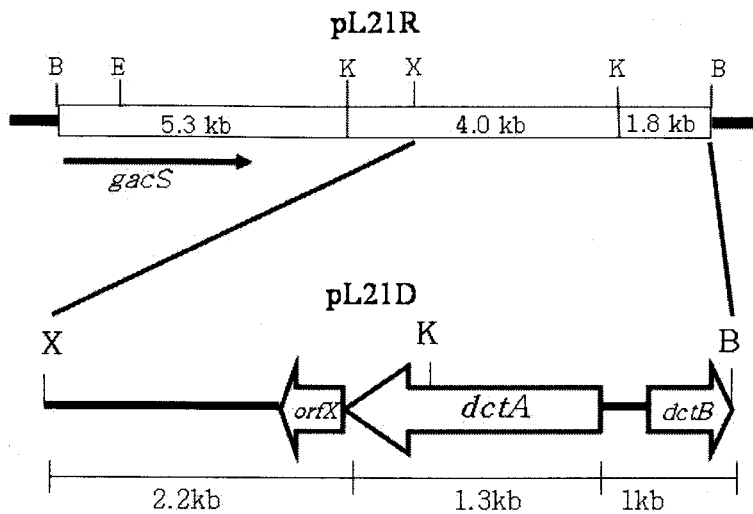


Fig. 1. Restriction enzyme maps of genomic DNA from *PcO6* in plasmids pL21R and pL21D containing the *dctA* gene. Arrows indicate the ORFs and the orientation of the genes. A partial sequence for a *dctB*-like gene is detected adjacent to *dctA*. Relevant restriction sites and fragment sizes are indicated: B, *Bam*HI; K, *Kpn*I; E, *Eco*RI; and X, *Xba*I.

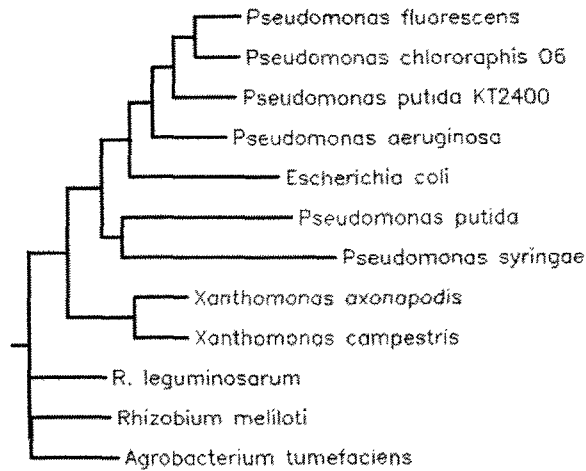


Fig. 2. Phylogenetic relationship between the *dctA* genes. Nt sequences were used in construction of the phylogenetic tree using the CLUSTRAL-W program based on the *dctA* genes from the completed genomes available from TIGR for *P. putida* KT2400, *P. fluorescens* 89 and *P. syringae* pv. tomato DC3000; and from GenBank for *A. tumefaciens* AE009259, *E. coli* K12 NC\_000913, *P. aeruginosa* AE004545, *P. putida* AF079997, *R. leguminosarum* Z11529, *R. meliloti* J03683, *X. axonopodis* NC\_003919 and *X. campestris*pv. *campestris* NC\_003902.

The deduced aa sequence had ten putative transmembrane domains. The sequence (TGGCACGGGCTTTGCG) located between nt 82 and 98 bp upstream of the predicted start codon of *dctA* was identical with the accepted sigma-54 binding site, TGGCACGrnnnTTGCw (Barrios et al., 1999). There was no sequence in the *dctA* gene promoter resembling a binding site for the cyclic AMP receptor protein (CRP) (Davies et al., 1999; Busby and Ebright, 1997). There was a potential rho-independent terminator located 14 bp downstream of the stop codon, consisting of a palindromic stem-loop structure ( $\Delta G = -15.6$  kcal/mole) followed immediately by six T's in the sense strand.

### 3.2. Expression and transcriptional regulation of the *PcO6 dctA* gene on different carbon sources and at various growth phases.

Expression of *dctA* was dependent upon carbon source and growth phase (Fig. 3A, 3B, 3C). A transcript of about 1,500 nucleotides was detected by Northern analysis from early log-phase cells grown in succinate-minimal medium (Fig. 3A). Expression was not detected in mid log- or late log-phase cells (Fig. 3A). With glucose as the sole carbon source there was only weak (Fig. 3A) to no transcript accumulation (Fig. 4) in the early log-phase cells (Fig. 3A). Addition of glucose to succinate (Fig. 3B) greatly decreased transcript accumulation from *dctA* in the early log-phase cells. The transcript level was lower in the early log-phase cells when malate was used as the carbon source in comparison with expression in cells grown on benzoate (Fig. 3C), fumarate (Fig. 3C), acetate (data not shown) or succinate (Fig. 3B).

The regulation of transcript accumulation by growth phase and carbon source was confirmed using RT-PCR (Fig. 4). The sizes of the PCR products were 179 bp for the *dctA* transcript and about 300 bp for the 16S rRNA product. The *dctA* transcript was more abundant from early-log phase *PcO6* cells (OD=0.1) grown on succinate and fumarate than on malate (Fig. 4A). When fumarate was used as a carbon source (Fig. 4B), more *dctA* product was produced with RNA from early log-phase cells than cells harvested at later growth stages. Low levels of *dctA* product were generated with extracts from cells grown on glucose (Fig. 4A, B, C). Addition of glucose to fumarate (Fig. 4C) reduced the level of *dctA* PCR-product from early log-phase cells compared with growth on fumarate alone, but levels were restored in the mid (OD<sub>600nm</sub>=0.7) and stationary phase (OD<sub>600nm</sub>=1.5) cells.

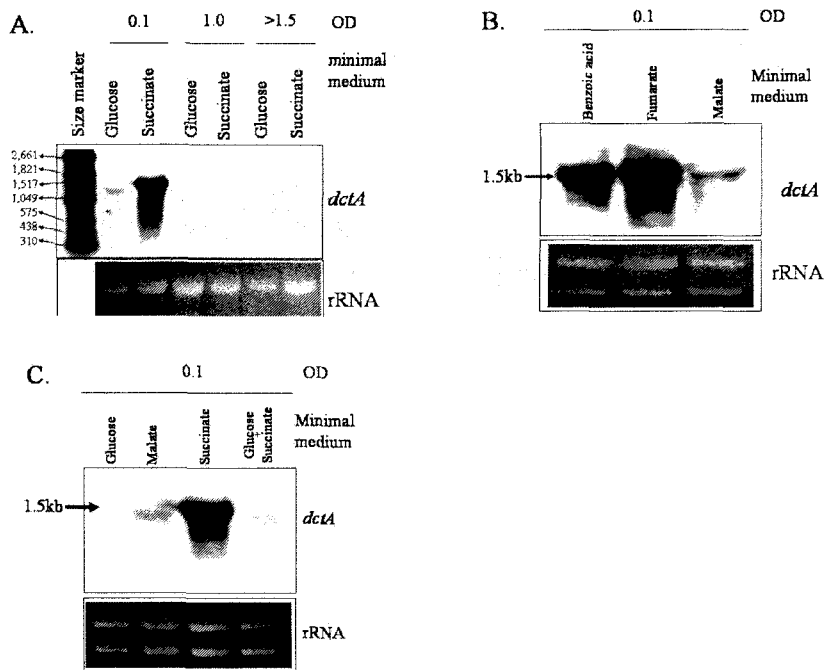


Fig. 3. Regulation of transcript accumulation for *dctA* in *PcO6* cells. Transcript accumulation for *dctA* in *PcO6* was determined by Northern analysis of cell extracts prepared at early (OD<sub>600nm</sub>=0.1), late log-phase (OD<sub>600nm</sub>=1.0) and stationary-phase (OD<sub>600nm</sub>=1.5). Transcript accumulation of rRNA was determined to control for equal loading of the lanes. Cells were grown in M9 medium containing: A, 0.2% glucose or succinate; B, 0.2 % glucose, malate, succinate, or 0.2% glucose plus 0.2% succinate; C, 0.2% benzoate, fumarate or malate.

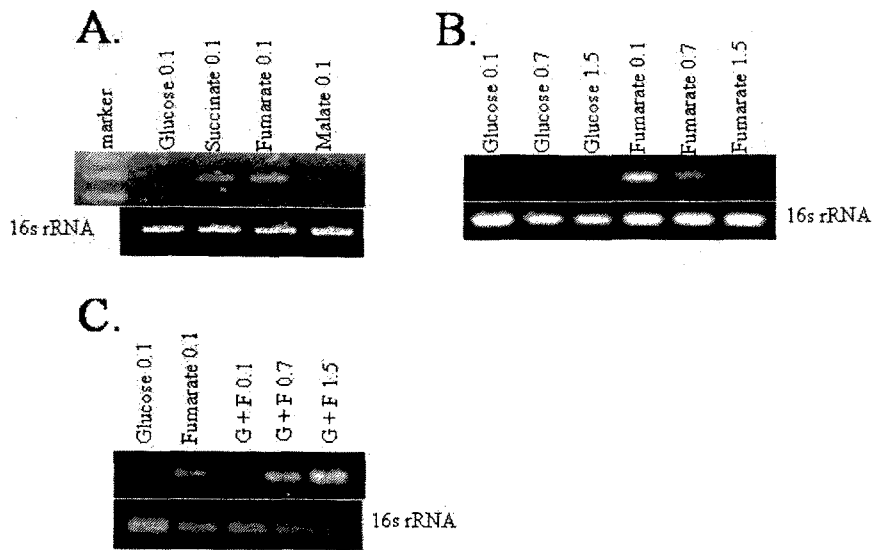


Fig. 4. Expression of *dctA* and rRNA genes in *PcO6* as detected by RT-PCR analysis. *PcO6* cells were grown to early-log phase (OD<sub>600nm</sub>=0.1); mid-log (OD<sub>600nm</sub>=0.7), or stationary-phase (OD<sub>600nm</sub>>1.5) on M9 medium containing: A, 0.2% glucose, succinate, fumarate or malate; B, 0.2% glucose or fumarate; C, 0.2 % glucose, fumarate or 0.2% glucose plus 0.2% fumarate. PCR products from the *dctA* and rRNA genes are shown.

### 3.3 Growth of the *dctA* mutant compared with the wild-type.

Construction of mutants, M1, M2 and M3, with insertions in the *dctA* gene of *PcO6* was confirmed by hybridization of a *dctA* probe to chromosomal *Bam*HI fragments that were larger in size from the mutants than from the wild-type (data not shown). Both the *dctA* mutant M1 and wild-type O6 strains grew equally well in liquid M9 medium containing glucose, fructose, sucrose or inositol as well as citrate. Growth rates and final cell densities were equivalent (data not shown). However, the *dctA* mutant did not grow on acetate, succinate, benzoic acid, or fumarate, each of which supported growth of the wild-type. On malate, growth of the *dctA* mutant was delayed in comparison with the wild-type although the subsequent rates of growth were comparable. When cells were grown on malate, transferred to glucose and inoculated back into malate the delay in growth was still observed for the *dctA* mutant (data not shown).

## 4. Discussion.

We deduce that the *dctA* gene from the root-colonizing pseudomonad *PcO6* encoded an H<sup>+</sup>/C<sub>4</sub>-carboxylic acid symporter essential for aerobic growth on certain organic acids. The sequences for the *PcO6* gene at the N terminus, between aa 35 and 54, had a 100% match, and at the C terminus, between 291 to 318, a 28/29 match with DctA proteins characterized as functional H<sup>+</sup>/C<sub>4</sub>-dicarboxylate symporters, rather than the Na<sup>+</sup> symporter class (Janausch et al, 2002). Homologues with near 90% identity to the *PcO6* *dctA* gene were detected in the genomes of other pseudomonads, *P. fluorescens* PfO-1, *P. aeruginosa* PAO1 and the plant pathogenic isolates, *P. syringae* pv. tomato DC3000 and pv. *syringae* B728a. Phylogenetically the DctA class of dicarboxylate transporters forms a discrete group removed from the other classes of dicarboxylic acid carriers involved in anaerobic transport in *E. coli*. Our prediction of ten transmembrane spanning regions for the DctA protein is consistent with the DctA proteins having a range between ten and twelve putative

transmembrane helices, whereas the anaerobically-functioning class has twelve transmembrane spanning domains (Janausch et al, 2002). However, the location of the *dctA* gene near to the *gacS* gene of *PcO6* is different from the locations of *dctA* genes from *P. aeruginosa* PAO1, *P. putida* KT2440 and *P. syringae* pv. tomato DC3000 based on searches in the TIGR data base, suggesting that chromosomal location is not conserved.

A putative histidine kinase with limited similarity to *gacS* was present, according to data in the TIGR data base, near the assigned *dctA* gene of *Sinorhizobium meliloti* 1021. The finding of a sequence upstream of *dctA* in *PcO6* (Fig. 1) resembling the *dctB*-like genes for putative sensor kinases in *P. fluorescens* PfO-1 and *P. aeruginosa* PAO1 suggests the potential for a sensor kinase-regulator pair as described for *Rhizobium* (Gilbin et al., 1995). Like the *dctA* gene from *Sinorhizobium*, the promoter of the *PcO6* *dctA* gene had a sigma factor-54-consensus sequence. At present the precise role of this alternative sigma factor is unclear in pseudomonads, although curiously they are suggested to be important in exponential-phase silencing of gene expression (Jurado et al 2003), a finding that does not agree with our observations of maximum transcript accumulation in early growth phase cultures of *PcO6* from *dctA*.

We demonstrated that the presence of glucose repressed *dctA* expression when succinate or fumarate was used as the dicarboxylic acids. This situation resembles the finding of catabolite repression in *E. coli* (Davis et al., 1999). However, we could not find any consensus for a cAMP-CRP binding site in the promoter sequence of the *PcO6* *dctA* gene, although this is the reported mode of regulation for *E. coli* (Davies et al., 1997; Janausch et al., 2002).

The *dctA* gene of *PcO6* was essential for utilization of the monocarboxylic acids, acetic and benzoic acids, and the C4-dicarboxylic acids, succinic and fumaric acids. The requirement by *PcO6* for *dctA* in the utilization of specific acids differs from that of *E. coli* and *Sinorhizobium meliloti*. Kay and Kornberg (1974) suggested there was a separate system for succinate uptake in *E. coli* because its *dctA* mutant was only delayed on succinate although there was no growth on fumarate and malate. In *S. meliloti*, expression of the *dctA* gene was essential for

symbiotic nitrogen fixation and transport of succinate, malate, and fumarate (Yurgel et al. 2000).

The organic acids utilized by *PcO6* in a *dctA*-dependent manner could be present in the rhizosphere either from root exudates or from the metabolism of other soil microbes. For instance, succinic and lactic acids are produced by the root-colonizing isolate, *P. putida* RSA9 (Yoshikawa and Hirai, 1993). Citrate, malate and succinate are the major dicarboxylic acids in tomato root exudates (Lugtenberg et al., 2001) and the *PcO6* *dctA* mutant was competent to grow on two of these components. Eventual growth of the *dctA* mutant on malate at wild-type rate suggested an alternative, possibly inducible mechanism, for malate transport in *PcO6*. Normal growth of the *dctA* mutant on citrate also indicated that *PcO6* uses another transporter system for this tricarboxylic acid. Other types of transporters for dicarboxylic acids are documented in bacteria and their differential control from the *dctA* H<sup>+</sup>- or Na<sup>+</sup>-symporter-class offers flexibility under different environmental stresses (Janausch et al., 2002).

Our finding that benzoate utilization by *PcO6* requires the *dctA* gene is novel. Studies with *Acinetobacter* sp. and *Azoarous evansii* show benzoate is transported by an ATP-dependent transport system, or a combination of outer membrane porin and inner membrane permease, respectively (Clark et al., 2002; Gescher et al., 2002). Benzoic acid is used in plants as a precursor for the salicylic acid that has a signaling function in the initiation of plant defenses (Leon et al., 1995). We have found that benzoic acid is a major component in the root exudate of cucumber grown under sterile conditions (unpublished data).

In addition to the presence of organic acids in root exudates, our analysis of bean root surface components revealed the presence of several simple sugars: glucose, inositol, xylose and fructose (Kim et al., 2000). As anticipated, the *dctA* mutation did not alter growth on carbon sources entering the cell by different transport systems. The use by *PcO6* of inositol as a sole carbon source agreed with its catabolism by other root- and rhizosphere-colonizing pseudomonads, *Rhizobium* and *Bacillus* species (Yoshida et al., 1997; Lugtenberg et al., 1999; Fry et al., 2001). Our findings that glucose only limited *dctA* expression in early cultures with



glucose plus fumarate as a mixed carbon source, would be consistent with preferential use of glucose over the fumarate. These observations suggest that the expression of *dctA* in cells of *PcO6* at the root surface may be transitory rather than constitutive. To understand the relative importance of each of these different types of carbon sources in root colonization by *PcO6*, we are conducting further studies with the *dctA* mutants to probe whether competency of *PcO6* in the rhizosphere is impaired.

## 제 10 절 *Pseudomonas chlororaphis* O6의 유기산 흡수에 관련된 *dctA* 유전자의 돌연변이주 분석

### 1. 서언

제 9 절에서 본 연구에서 공시 작물로 사용했던 오이의 뿌리 분비액에 당의 함량보다 유기산의 함량이 높아 이들 유기산 이용이 *P. chlororaphis* O6균주의 식물 뿌리 정착 능력과 내병성 유도 능력에 중요한 역할을 할 것으로 사료되어 유기산 흡수에 중요한 역할을 수행하는 dicarboxylate transporter를 암호화한 *dctA* 유전자를 클로닝하여 유기산에 의해서만 특이하게 유도되고 당에 의해서는 catabolite repression에 의해 억제되는 결과를 보여 주었다. 또한 *dctA* 돌연변이주는 유기산만이 첨가된 최소배지에서는 생육하지 못했고, 당이 첨가된 배지에서 wild type과 같이 생육함을 관찰하였다.

본 절에서 *dctA* 유전자의 promoter를 부위를 알아보기 위해 primer extension에 의해 *dctA* 유전자의 promoter 부위를 찾았고, 이들의 발현 양상을 RT-PCR 방법에 의해 발현 정도를 관찰하고, *dctA* 돌연변이주를 조제하여 *dctA* 유전자가 식물 뿌리 정착 능력이나 병 저항성 유도 능력에 관여하는 지를 알아보기 위해 본 실험을 실시하였다.

### 2. 재료 및 방법

#### 가. *DctA* 유전자의 transcription start site 동정

*P. chlororaphis* O6 유전자의 +1 site를 동정하기 primer extension 방법을 이용하여 동정하였다. 제 9절에서 *dctA* transcript는 최소배지에서 fumarate를 첨가한 조건에서 발현이 최대로 나타나 O6균주를 fumarate를 첨가한 최소배지에서 mid-log까지 생육시킨 후, Tri reagent 방법으로 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 template로 하여 P<sup>32</sup> 5'end label된 primer로 reverse transcription을 실시하여 single strand DNA를 합성한 후, 같은 primer로 *dctA* 유전자를 지닌 plasmid clone을 sequencing 한 후, sequencing gel에 전개하여 +1 site를 동정하였다.

*DctA*의 발현 양상을 질소원이 부족한 상태와 과 질소 상태의 조건에

서 확인하기 위해 각기 다른 농도의 ammonium sulfate를 포함한 glucose가 첨가된 최소배지에서 O6균주를 생육시켜 total RNA를 추출한 다음 *dctA* specific primer를 이용하여 RT-PCR를 하여 발현 양상을 조사하였다.

나. 뿌리 정착 능력과 병 저항성 유도 능력.

본 절에서 조제한 *P. chlororaphis* O6의 *dctA* 돌연변이주의 뿌리 정착 능력은 오이를 공시 작물로 이용하여 cfu/g of root로 나타냈으며, 병 저항성 유도 능력은 오이와 갈반병균을 공시작물과 병원균으로 사용하여 병 저항성 유도 능력을 조사하였다. 자세한 방법은 상기의 절에서 구체적으로 논의되었다.

다. 탄소원 이용 능력 검정.

제 9절에서와 같이 *dctA* 돌연변이주가 당 혹은 유기산을 탄소원으로 사용하는 지를 알아보기 위해 0.2%의 다양한 carbon source를 유일한 탄소원으로 제고하여 wild type, *dctA* 돌연변이주, complemented *dctA* 돌연변이주들의 생육 여부를 M9 minimal agar plate에서 확인하였다.

### 3. 결과 및 고찰

가. *DctA* 유전자의 promoter 부위 분석

*DctA* 유전자의 promoter 부위를 분석하기 위해 primer extension을 실시하여 *dctA*의 +1 site를 동정하였다. *DctA* 유전자의 start codon인 ATG로부터 68 bp upstream G가 +1로 동정되어 -10과 -35 sequence를 유추해본 결과, -10은 TTCAGT이었고, -35는 TTCCCCGC로 추정되었다 (Fig. 1 and Fig. 2). -10과 -35 sequence의 upstream에 RNA polymerase의 sigma factor 54 binding site와 상동성이 아주 높은 sequence (TGGCACGGGCTTTGCG)가 존재하였다 (Fig. 2). 이러한 결과는 *dctA* 유전자가 질소의 농도에 의해 조절될 가능성이 높다. 왜냐하면 일반적으로 시그마 인자 54는 질소 영양분이 부족

한 상태에서 여러 적은 질소 조건에서 생존하고 생육하기 위해 필요한 유전자들의 발현을 촉진하는 RNA polymerase sigma factor이다. Sigma factor 54의 consensus sequence를 가진 유전자들은 저 농도의 질소 농도에서 발현이 증가되는 유전자들이 일반적으로 증가되는 결과를 초래한다.

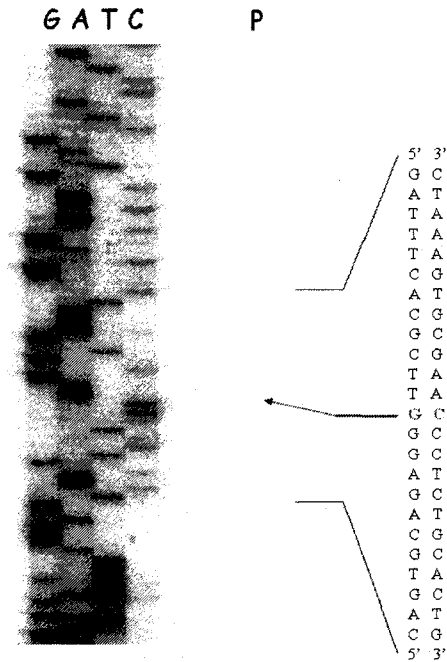


Fig. 1. Determination of the *dctA* transcriptional start site by reverse transcriptase-mediated primer extension. RNA was isolated from O6 grown aerobically in M9 minimal medium contained fumarate as sole carbon source. Lane P indicates the primer extension production with the primer for *dctA*. The sequencing ladder (lanes A, C, G, and T) was generated by using primer for *dctA* and plasmid that contained full *dctA* sequence including upstream as template. The corresponding nucleotide sequence, its complement, and the transcriptional start site (indicated by an arrow) are shown.

**GGACAAGGCGGATATCCGCCAAATTGTAGGACGAGGGCCGGATGATGGGCGGAAATCCGC**

**CACTTCGTGTGGGGCGAGGAGCGCGAAGGGCBAGAGCAAACCCTGATGTCCAAAGGCCTT**

**σ-54 binding site**

**CAGGTTTTTTGGGCAAGCTGGCACGGGCTTTGCGATAGCGAGCGAGGAGAAGGGAGCAGC**

**GAAAGGTGTTCCCCGCAGTCTACACAACAAATCCCTTCAGTGCAAGAGGGTTCGCACTTT**  
-35 -10 +1

**AGGCCTCGTGTGCATCGATGGATGGTGTGCAACGGTGCTCTTGAGGAACTTTGCAATGAC**  
R.B. *dctA* →  
M

Fig. 2. Nucleotide sequence of the *dctA* promoter region. The experimentally determined +1 site is labeled, as are the deduced -35 and -10 sites. Residues matching the corresponding consensus sequence for the sigma factor-54 binding site, -35, -10, +1, and Shine-Dalgarno (R.B) sites are indicated. The positions of the predicted start codon of *dctA* is indicated.

*P. chlororaphis* O6의 *dctA*가 질소원의 공급에 의해서도 조절되는 지를 알아보기 위해 O6균주를 질소원의 농도가 다른 두가지 조건에서 생육시킨 후 RNA를 분리하여 *dctA* transcript의 발현 정도를 RT-PCR을 이용하여 조사하였다. 예상대로 *dctA* transcript는 질소원이 충분한 조건에서 보다 질소원이 부족한 조건에서 발현이 증가하였다 (Fig. 3). 이러한 결과는 *dctA* 유전자의 promoter 부위에 RNA polymerase의 sigma factor-54 binding site의 consensus sequence가 존재함에 기인하는 것 같다. 일반적으로 세균 세포가 질소원이 부족할 때 sigma factor-54가 발현되어 질소분이 부족한 경우에 필요한 유전자의 발현을 촉진한다. 따라서 *dctA* 유전자도 sigma factor-54에 의해 조절되는 하나의 유전자일 것으로 추정된다.

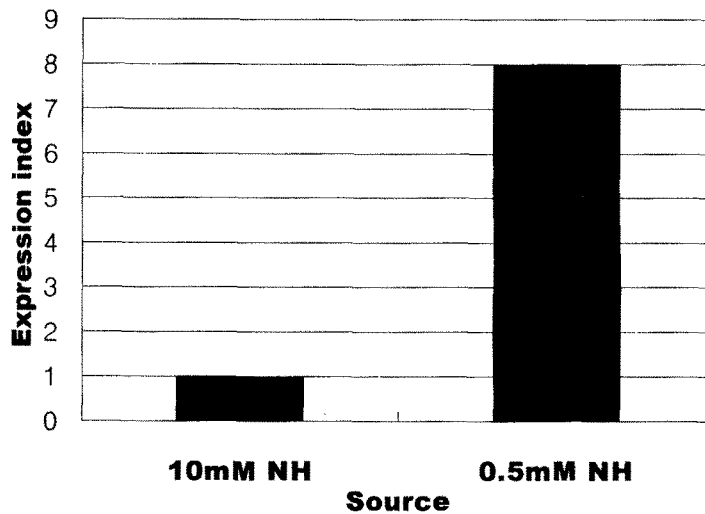


Fig. 2. Induction of *dctA* system by nitrogen limitation. Transcription of *dctA* was examined by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with total RNA from O6 cells grown on different concentrations of glucose-ammonia.

나. *DctA* 돌연변이주의 조제 및 특성 분석.

제 9 장에서 조제한 *dctA* 돌연변이주의 탄소원 이용 능력, 오이 뿌리 정착 능력, 그리고 식물병 저항성 유도 능력 등 O6균주의 유용형질들을 조사하였다. 먼저 *dctA* 유전자가 유기산의 흡수에 관여하는 transporter의 기능을 가지고 있기 때문에 돌연변이주와 complemented 돌연변이주들을 당이나 유기산을 sole carbon source로 첨가한 최소 배지에서 생육 여부를 조사하였다 (Table 2). *P. chlororaphis* O6 wild-type은 본 연구에서 사용된 glucose, fumarate, malate, succinate, acetate, citrate, 그리고 benzoic acid들을 탄소원으로 모두 잘 이용한 반면, *dctA* 돌연변이주는 glucose와 citrate만을 탄소원으로 생육하였으나 다른 유기산을 탄소원으로 첨가한 조건에서는 생육하지 못하였다 (Table 2). 그러나 *dctA* 돌연변이주는 malate를 탄소원으로 긴 lag-phase을 보여주기는 했지만 생육하였다. 이는 제 9절에서의 northern 과 RT-PCR 분석에 의한 결과에 의하면 *dctA*의 유전자 발현이 유기산의 종류에 따라 달랐으며, 특히 malate를 첨가한 배지에서는 *dctA* 발현이 현저히 감소하였다. 이러한 결과는 아마도 거의 대부분의 유기산은 *dctA*에 의해 흡수되지만, malate와 같은 유기산은 다른 알려지지 않은 경로를 통해 흡수될 것으로 생각된다. *DctA* 돌연변이주의 표현형은 native *dctA* 유전자에 의해 wild-type의 표현형으로 회복되었다 (Table 2).

Table 2. Effect of the *dctA* mutation on growth of *P. chlororaphis* O6 on different carbon sources <sup>a</sup>

Strains	Carbon sources			
	Glucose	Fumarate	Malate	Succinate
Wild-type	++	++	++	++
<i>dctA</i> mutant	++	-	+	-
Com- <i>dctA</i>	++	++	++	++

<sup>a</sup> Growth of the O6 strains under aerobic conditions in M9 minimal salts medium containing 0.4% glucose or 0.4% various organic acids as sole carbon source was determined by measuring optical density of cell culture at 600 nm during cultivation. ++; growth rate at wild-type, +; growth rate delayed, -; no growth.

제 8절의 결과 오이 뿌리 분비액의 탄소원의 조성을 알아본 결과, 유기산의 농도가 당의 농도보다 약 10배 이상 존재하여 *P. chlororaphis* O6에서 유기산의 이용 능력이 식물 뿌리 정착에 중요한 인자로 작용할 것으로 추정되었다. 따라서 *dctA* 돌연변이주와 wild-type의 오이 뿌리 정착 능력을 조사하였다. *P. chlororaphis* O6 wild-type 균주는 파종 후 5일 째에  $3 \times 10^7$  cfu/g of root로 최고 농도를 나타내다가 점차 농도가 감소하여 파종 후 11일 째에는 약  $10^5$  cfu/ml의 농도를 유지하였다 (Fig. 3). 하지만 *dctA* 돌연변이주의 경우, 파종 후 5일후의 농도가 약  $1 \times 10^6$  cfu/g of root로 wild type의 농도에 비해 10배 정도 낮았으나, 그 이후의 농도는 wild-type과 차이를 보이지 않았다 (Fig. 3). 접종 후 5일 째 wild type의 균의 농도에 비해 *dctA* 돌연변이주의 농도가 약 10배정도 낮은 이유는 *dctA*의 돌연변이주가 오이 뿌리 분비액에 존재하는 당 만을 탄소원으로 이용할 수 있고, 유기산을 이용할 수 있는 능력이 상실되었기 때문에 오이 뿌리에서의 생육 능력이 wild type에 비해 떨어지는 것으로 사료된다.

*P. chlororaphis* *dctA* 돌연변이주는 다른 이차 대사산물의 생산 능력이나 식물병원균의 생육 억제 능력은 wild-type에 차이를 보이지 않았다 (data not shown). 그러나 *dctA* 돌연변이주의 오이 갈반병을 이용한 식물병 저항성 유도 능력을 wild-type과 비교해 본 결과, wild-type O6 균주를 뿌리에 접종한 구에서는 물을 관주한 control에 비해 오이 갈반병 병반의 수나 크기가 현저히 감소하여 오이 갈반병균인 *Corynespora cassicola*에 대해 병 저항성 유도 능력을 보여 주었다 (Fig. 4). 하지만 *dctA* 돌연변이주는 균주를 처리하지 않은 control과 발병율을 보여 O6 wild-type균주가 가지고 있었던 병저항성 유도 능력이 상실되었다. DctA 돌연변이주가 병저항성 유도 능력을 상실한 것은 아마도 2가지 가능성으로 설명할 수 있을 것이다. 첫 번째로 *dctA* 돌연변이주의 오이 뿌리 정착 시 wild-type에 비해 고농도로 존재하지 못하여 병 저항성 유도 능력이 상실될 가능성이 있다. 일부 세균의 유전자들은 cell-density dependent에 따른 유전자가 발현이 되기 때문에 만약 DctA 돌연변이주가 wild-type의 최고 세균 밀도에 도달하지 못했을 때는 아마도 병저항성 유도 능력에 관여하는 유전자들이 발현이 되지 않을 가능성도 있다. 한 가지 가능성으로 O6균주가 식물병 저항성 유도를 위해서는 유기산 대사 작용이 필수적인 요인으로 작용하거나 병저항성 유도 인자를 생합성하기 위해서는 유기산이 탄소원으로 필요할 가능성도 있다.



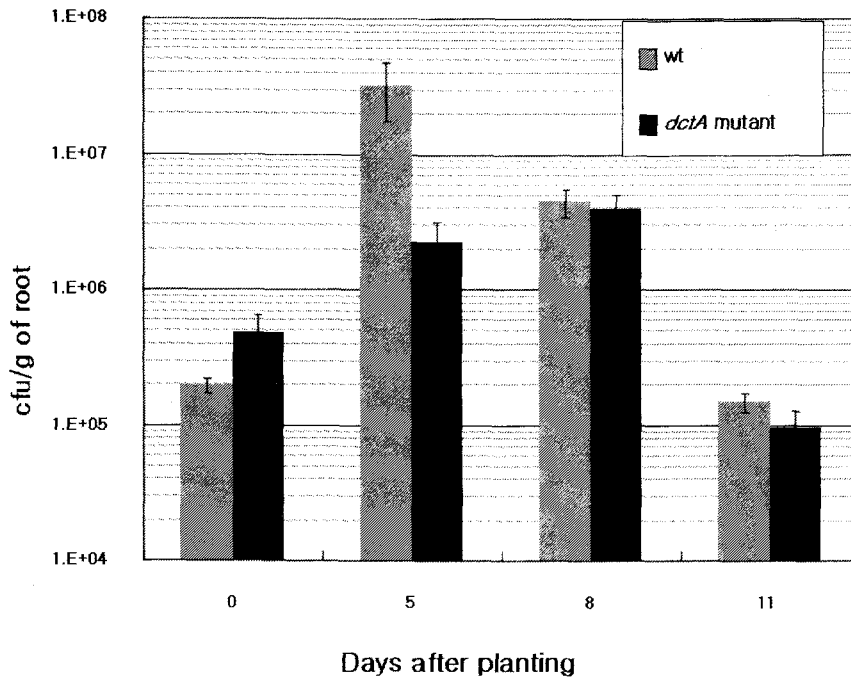


Fig. 3. Colonization of *P. chlororaphis* O6 *dctA* mutant on cucumber roots inoculated under non-competitive conditions. At defined times, cell numbers were determined by plating serial dilutions of root washes on LB agar plates containing appropriate antibiotics. The means of three separate experiments are represented, and the standard deviations are represented by the vertical bars.

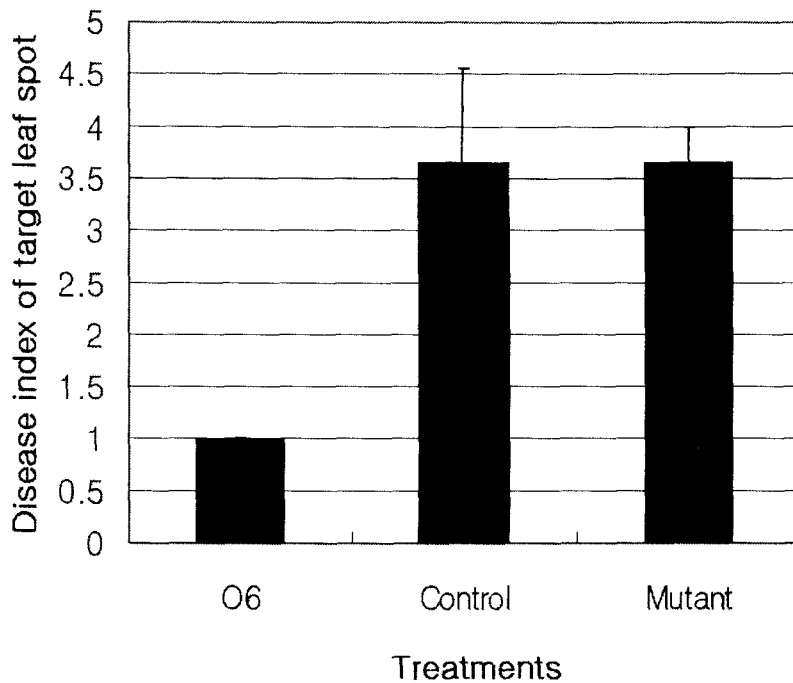


Fig. 4. Induced resistance against a foliar target leaf spot disease caused by *C. cassicola* in cucumber leaves of plants with roots colonized by *P. chlororaphis* O6 wild-type and *dctA* mutant. Plants with ISR were raised from seeds coated with O6 wild-type and *dctA* mutant cells suspended in 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0) and an equal volume of 2% methylcellulose. Control seeds were coated with the same suspension without O6 cells (control). After sowing, 20 ml of the O6 wild-type (O6) and *dctA* mutant (Mutant) cells in King's B medium or same volume of cultural medium (Control) were applied once around the seedling, per pot. Disease severity was estimated 4 to 6 days after challenge inoculation by counting the total lesion number produced on the fully expanded 2<sup>nd</sup> leaf. The data are mean numbers ± standard deviation analyzed from four different experiments, each consisting of 10 plants.

## 제 11 절 Gene expression analysis in cucumber leaves primed by root colonization with *Pseudomonas chlororaphis* O6 upon challenge-inoculation with *corynespora cassiicola*

### 1. Introduction

A large number of rhizobacteria are present on the surface of plant root where nutrients are provided by plant exudates. Increased plant productivity often results from the suppression of plant pathogens through induction of systemic disease resistance by root colonization with certain strains of non-pathogenic rhizobacteria. The rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) is demonstrated against fungi, bacteria, and viruses in various plant species in which the rhizobacteria and the challenging pathogen are spatially separated (van Loon et al., 1998). Rhizobacterial strains differ in their ability to cause ISR in different plant species (van Loon et al., 1998). The ISR may be involve signaling pathways in which jasmonic acid and ethylene play key roles (Pieterse et al., 1998), or may be associated with the salicylic acid-dependent pathway, being related with enhanced expression of PR-1a gene (Park and Kloepper, 2000). Rhizobacterial strains may cause resistance to abiotic stresses in plants. In *Arabidopsis thaliana*, root colonization by *Paenibacillus polymyxa* induced resistance to drought and challenge by *Erwinia carotovora* (Timmusk and Wagner, 1999). Transcripts of a gene responding to desiccation stress, *ERD15*, accumulate in these plants (Timmusk and Wagner, 1999).

*P. chlororaphis* O6 was isolated from the roots of field-grown wheat just prior to harvest (Radtke et al., 1994). Colonization of tobacco roots by O6 caused ISR effective against to two foliar bacterial pathogens, the wild fire pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *tabacci* and *Erwinia cartotovora* subsp. *carotovora*, a soft rot (Spencer et al., 2003). Expression of defense-related genes such as *PR1-g*, *HMGR* and *LOX* was induced in

leaves of plants by root colonization of O6 without pathogen infection (Spencer et al., 2003). In this work, we investigated whether O6 induced ISR in cucumber against foliar target leaf spot disease caused by *C. cassiicola*. In addition, we isolated cucumber genes related ISR, which induced by colonization of *P. chlororaphis* O6, by subtractive hybridization.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Bioassay of induced systemic resistance

For seed coating, *P. chlororaphis* O6, grown on King's medium B agar, were suspended in 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0), and an equal volume of 2% methylcellulose was then added. The bacterial suspension was mixed with surface-sterilized cucumber (*Cucumis sativus* L., variety Baekseong) seeds, resulting in  $5 \times 10^8$  to  $1 \times 10^{10}$  CFU per seed. Seeds were air-dried overnight in a laminar flow hood (Raupach and Kloepper, 1998) and planted to an approximately 1-cm depth in a 10 cm<sup>2</sup> polyvinyl pot containing 500 cm<sup>3</sup> of sterilized soilless growing medium (peat moss 7: vermiculite 3). Seedlings were raised in a growth chamber with a 10 h day (25 °C)/14 h night (20 °C) cycle at 70% relative humidity with daily watering. One week after sowing, when cotyledons were developed, 20 ml of O6 cells in culture medium ( $1 \times 10^8$  cfu/ml) were applied to each seedling root.

Four-week-old plants with roots colonized by O6 strain were challenge-inoculated with *C. cassiicola*, a target leaf spot pathogen of cucumber, by spraying a conidial suspension ( $5 \times 10^4$  spores/ml of sterile water) and maintaining a 100% relative humidity for 12 h. Four to six days after challenge inoculation, disease severity was assessed by determining the number of target leaf spots per on the fully expanded second leaf.

### 2.2. Differential subtractive hybridization.

Total RNA was isolated from cucumber leaves by the Phenol/SDS/LiCl method (Zhu et al., 1998[18]). A cDNA library was constructed

using cDNA Synthesis Kit/ZAP-cDNA Synthesis Kit/ZAP-cDNA Gigapack II Gold Cloning Kit (Stratagene) using the poly (A)<sup>+</sup> RNA extracted from the O6-colonized cucumber leaves 12 h after inoculation with *C. cassicola*. Subtractive hybridization was performed as described in CLONETECH PCR-Select<sup>TM</sup> cDNA Subtraction Kit User Manual (CLONTECH). For subtraction, double-stranded cDNAs were synthesized separately from 2 $\mu$ g of poly (A)<sup>+</sup> RNAs extracted from cucumber leaves 12 h after *C. cassicola* infection from plants with and without root colonization of O6.

### 3. Results and Discussions

Analysis of the data from four experiments indicated that root colonization by O6 significantly decreased the number and size of target leaf spots compared to controls, where the plants were not colonized by O6 (Fig. 1). Initial onset of disease was delayed, and final incidence was reduced. The average reduction in total lesion number per leaf was 75% in plants colonized by O6. Therefore, colonization of O6 on the cucumber roots induced systemic resistance against target leaf spot, a foliar disease caused by *C. cassicola*. Since *P. chlororaphis* O6 colonization on tobacco roots also protects against bacterial pathogens, such as *P. syringae* pv. *tabaci* and *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Spencer et al., 2003), O6 root colonization induces nonspecific systemic resistance on plants with a broad-spectrum activity of protection.

To obtain an insight into the nature of the O6-mediated ISR, we employed a subtractive hybridization method. We identified genes with increased expression in the protected plants by screening from differentially accumulated mRNAs. In differential screening of approximately 50,000 recombinant clones of the cDNA library, about 100 clones showed stronger hybridization signals with the ISR-enriched cDNA probe than with the control probe without O6 treatment. Examination of the expression kinetics of 20 selected clones revealed that six genes were induced more rapidly by challenge inoculation with the causal fungus in the O6-colonized than non-colonized plants (Fig. 2 and Table 1) Previously, Benhamou et al., (1996) reported that the cell walls of ISR-expressing bean plants were

more rapidly strengthened at sites of attempted fungal penetration to limit fungal ingress. We proposed that a similar phenomenon of accelerated gene expression in plants colonized by O6 may account for the ISR demonstrated in cucumber against *C. cassiicola*.

One of the more rapidly expressed genes, clone CsISR04 (Fig. 1), encoded a hypersensitive-induced response protein, documented to be involved in a defence reaction. Plants frequently respond to pathogen attack with the "hypersensitive response" (HR), a rapid localized necrosis at the site of infection that cordons off the pathogen and limit its spread (Dangl et al., 1996). The HR-activated protein family is conserved in monocot and dicot plants, and appears to play a role in induced plant cell death (Nadimpalli et al., 2000).

The ISR-differentially expressed clone *CsISR02*, shared high sequence similarity with 60S ribosomal protein, L5 (RPL5), that binds to 5S ribosomal RNS in plants (Mathieu et al., 2003) (Fig. 1). RLP5 homologues are involved in cellular processes in other cells under stress. In human senescent fibroblasts, RLP5 interacts with the C-terminal region of PDCD4, the product of another gene involved in programmed cell death (Kang et al., 2002). An RPL5 gene was up-regulated in a slow growing astrocytoma tumor that may become anaplastic and, eventually, progress to a glioblastoma (Huang et al., 2000). Therefore, O6 colonization may induce systemic resistance by conferring HR response in cucumber leaves against the fungal pathogen.

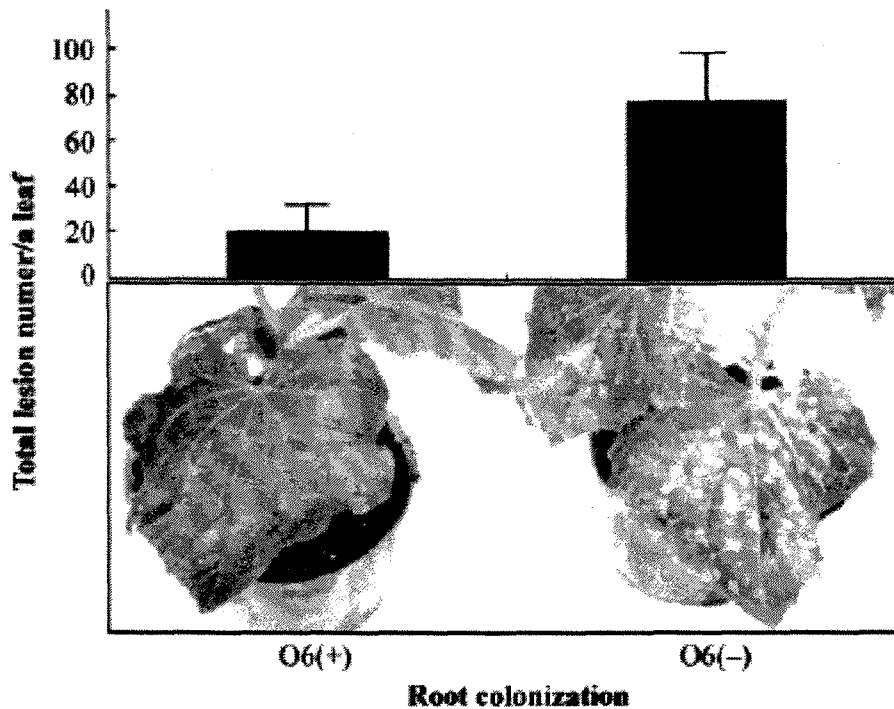


Fig. 1. Protection from a foliar target leaf spot disease caused by *C. cassicola* in cucumber leaves of plants with roots colonized by *P. chlororaphis* O6. Plants with ISR were raised from seeds coated with O6 cells (O6[+]) suspended in 0.02M phosphate buffer (pH 7.0) and an equal volume of 2 % methylcellulose. Control seeds were coated with the same suspension without O6 cells (O6[-]). After sowing, 20 ml of the O6 cells in King's B medium (O6[+]) or same volume of cultural medium (O6[-]) were applied once around the seedling, per pot. Disease severity was estimated 4 to 6 days after challenge inoculation by counting the total lesion number produced on the fully expanded 2 nd leaf. The data are mean numbers  $\pm$  standard deviation ( $77.3 \pm 21.7$  for O6 [-] and  $19.3 \pm 12.4$  for O6 [+]) analyzed from four different experiments, each consisting of 10 plants.

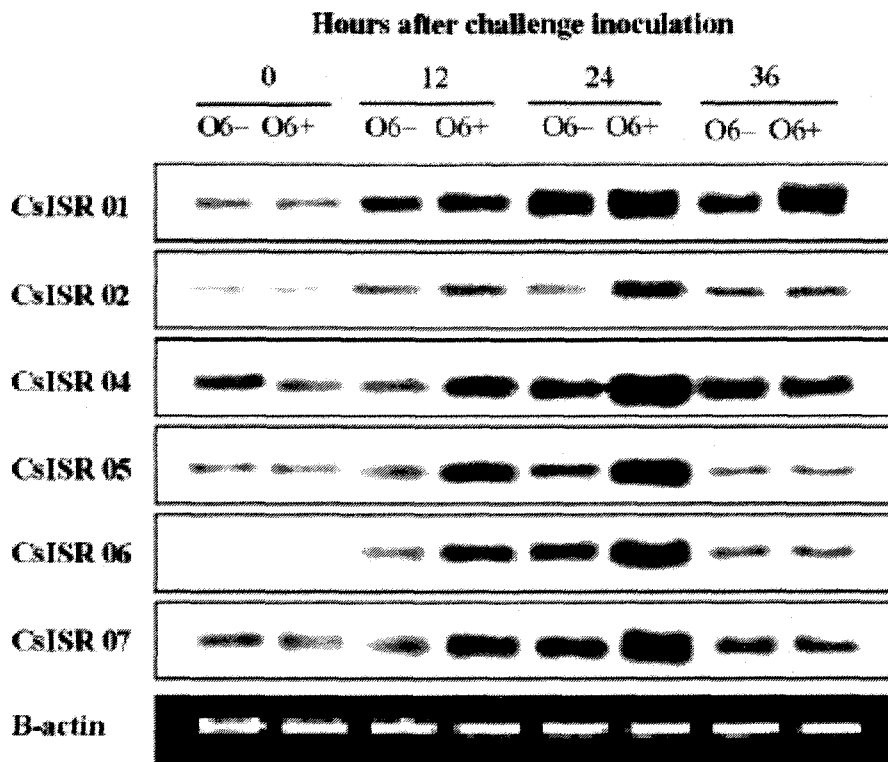


Fig. 2. Northern blot analysis of total RNA extracted from the cucumber leaves 0, 12, 24, and 36 h after challenge inoculation of *C. cassicola* with (O6 [+]) and without (O6 [-]) O6 treatment. A 20  $\mu$ g aliquot of total RNA was loaded per lane. The RNA blot was probed with P<sup>32</sup>-labelled cDNAs and washed at high stringency. RNA equal loading was checked by hybridization of the blot with a probe corresponding to the cucumber  $\beta$ -actin gene transcript. RT-PCR for the transcript was performed using primers (Forward, 5'-GGC CGT TCT GTC CCT CTA C-3'; reverse, 5'-CAG CTC CGA TGG TGA TGA C-3') and a sensitive fluorescence-based RT-PCR system (QuantiTech SYBR Green RT-PCR Kit [Quiagen]).



A third differentially expressed gene was CsISR01, with high homology to the GTP binding protein, Rab7 gene (Fig. 1). In plant cells, a superfamily of small GTP-binding proteins, including Ras, Rho, Rab, Art, and Ran, regulated diverse cellular responses (Yang, 2002). Morphological and biochemical studies indicate that different members of the Rab homologs have a distinct subcellular distribution, and each member is associated with a particular intracellular compartment along the exocytic and endocytic pathways (Rutherford and Moore, 2002).

A fourth clone, CsISR05, encoded a ubiquitin/ribosomal protein, S27a. Ubiquitin proteins are involved in various fundamental cellular processes. Expression of the tomato homologue for the *CsISR05* was reduced in heat-shocked plants and plants kept in the dark (Hoffman et al., 1991). Messenger RNA level of the human homologue of *CsISR05* was higher in tumor tissue than in adjacent normal mucosa taken from colon cancer patients (Wong et al., 1993). The clones, *CsISR06* and *CsISR07*, encode proteins with high homology to the *Arabidopsis* pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase and signal recognition particle receptor, respectively. However, functions of those genes in plant disease resistance or ISR are currently unknown.

We conclude that root colonization in cucumber by O6 causes ISR against the fungal target spot pathogen, which is accompanied by more rapid expression of certain genes, such as those listed in Fig. 1. As suggested by Conrath et al. (2002), therefore, one of the mechanisms for ISR may be explained with priming phenomenon induced by rhizobacteria, an enhanced capacity to mobilize challenge infection-induced cellular defence responses.

Table 1. Inferred properties of proteins encoded by genes increased in expression after pathogen challenge of cucumber plants with roots colonized by O6<sup>a</sup>. These genes showed increased rates of transcription in comparison with plants without O6 root colonization.

Clone	Accession	Putative identification <sup>b</sup>	Source of comparison <sup>c</sup>	e-value <sup>d</sup>
CsISR 01	AY365246	GTP binding protein Rab7	<i>Nicotiana tabacum</i> (T03629)	e-112
CsISR 02	AY365248	60S ribosomal protein L5	<i>Pisum sativum</i> (BAB33422)	e-118
CsISR 04	AY365247	hypersensitive-induced reaction protein	<i>Hordeum vulgare</i> (AAN17462)	e-136
CsISR 05	AY372537	ubiquitin extension protein	<i>Lycopersicon esculentum</i> (UQTO7A)	1e-69
CsISR 06	AY372539	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	<i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_190005)	e-118
CsISR 07	AY372539	signal recognition particle receptor	<i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_194789)	e-151

<sup>a</sup> Sequence comparisons were performed with the BLAST search from the National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA)

<sup>b</sup> Sequence homology according to the NCBI BLAST search results.

<sup>c</sup> GenBank/EMBL/SwissProt accession number for known sequences with the closest match according to the NCBI BLAST search.

<sup>d</sup> Expected values greater than  $e^{-2}$  are considered not statistically significant.

## 제 12 절 *P. chlororaphis* O6균주에 의해 유도되는 galactinol synthase (*CsGols2*) 유전자의 발현 특성 규명

### 1. 서론

제 11 절에서 *P. chlororaphis* O6가 오이 뿌리에 정착함으로써 오이 갈반병의 침입에 의해 빨리 유도되는 여러 가지 식물병 저항성에 관련된 유전자들이 물을 전처리하고 병원균을 처리한 구보다 빨리 유도되어 *P. chlororaphis* O6가 식물을 병저항성이 되게 Priming하는 역할을 하는 것으로 추정되었다. 본 절에서는 제 11절에서 Differential screening에 의해 선발된 25여개의 cDNA clone중 12시간 정도 빨리 발현될 뿐만 아니라 그 증폭발현의 폭이 가장 컸던 galactinol synthase 유전자 (*CsISR00*, *CsGols2*)의 발현 특성을 규명하고자 하였다.

### 2. 재료 및 방법

#### 가. 공시작물

본 실험에는 일본 수입종인 백성3호 오이를 사용하였고 종자를 2% sodium hypochlorite로 10분동안 상온에서 50rpm으로 shaking하면서 표면 살균하였다. 살균된 종자를 멸균수에 20분씩 3차례 씻어내어 건조시킨 후 바이오상토와 버미큘라이트를 7:3으로 섞은 멸균된 상토에 파종하였고 이를 27℃, 80% RH의 growth chamber에서 키운 후 실험에 사용하였다.

#### 나. 공시 균주 및 병원균 접종 방법

본 실험실에서 확보하고 있는 rhizobacteria인 *Pseudomonas chlororaphis* O6를 공시 균주로 사용하였다. *P. chlororaphis* O6균주는 작물의 성장을 촉진할 뿐만 아니라 phenazine, HCN, protease등의 항균 물질을 생산하는 생물적 방제균으로서 본 실험실에서 수행중인 여러 가지 연구의 재료로 이용되고 있다. O6 균주를 King's medium B (KB) 고체배지에 접종하여 28 ℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 오렌지 빛깔을 띠는 O6균을 끓여모아 0.02 M

phosphate buffer (pH 7.0)에 현탁한 다음, 동량의 2% methylcellulose (Sigma)와 잘 섞어주었다. 종자 당  $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$  colony forming unit (cfu)의 농도로 공시 균을 코팅한 후 후드에서 자연 건조시켰다. 멸균한 상토에 균을 코팅한 오이 종자를 파종하여 일주일 후 2 개의 자엽이 형성되었을 때,  $1 \times 10^8$ 의 농도로 조정된 O6균주 현탁액을 20 ml 씩 뿌리주위의 토양에 관주해 주었다. 병원균으로는 오이에 갈색의 일반점 증상을 일으키는 갈반병균 (*Corynespora cassiicola*)을 사용하였다. *C. cassiicola*를 Czapek solution agar (CSA; Difco) 배지에 접종하여 28 °C의 암 상태에서 2 주간 배양하였고 자라난 기중균사를 멸균된 부드러운 붓으로 제거한 후 후드에서 자연건조시켰다. 건조된 배지를 2,000 lux 정도의 빛이 내리쬐는 28 °C의 항온기에서 일주일간 배양하여 포자를 형성하였다. 형성된 포자를 멸균수에  $5 \times 10^4$  spores/ml의 농도로 조정하여 오이 잎에 분무 접종하였다.

병저항성 검정 실험재료로 *Arabidopsis thaliana*도 사용하였는데, *A. thaliana*에 병을 일으킬 수 있는 곰팡이인 *Botrytis cinerea* 4709를 28 °C의 항온기내 PDA배지에서 계대 배양하였고, 분생포자 형성을 위해서는 균총을 1/2 PDA배지에 옮긴 후 균사가 충분히 배지를 덮었을 때 창가에 반나절에서 하루정도 놓아두었다. 현미경상에서 spore 형성을 확인한 후 이를 PDB에 현탁하여 *Arabidopsis* 잎에 3-5 $\mu$ l씩 drop 하였다. 접종 농도는  $2 \sim 4 \times 10^4$  spores/ml로 맞추었고 접종 후 7-10일 후에 병반을 확인하였다.

#### 다. Northern analysis

O6균을 접종한 오이 잎과 O6균을 접종하지 않은 오이 잎에 각각 *C. cassiicola* (challenger)를 처리하였고, 0, 12, 24, 36, 48, 72시간이 지난 오이 잎으로부터 total RNA를 추출하여 1.2% formaldehyde/ agarose gel에 전기영동한 다음 nylon membrane에 blotting하였다. 각 유전자의 specific expression pattern을 보기 위해 3'untranslated region에서 primer를 제작하여 PCR로 증폭한 다음 P<sup>32</sup>로 labeling한 probe를 이용하였다.

#### 라. RT-PCR analysis

획득한 유전자들의 유도발현 정도를 양적으로도 살펴보기 위하여 Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)을 수행하였다. O6를 접종한 오이의 잎과 O6를 접종하지 않은 오이의 잎에서 *C. cassiicola*

(challenger)를 처리하여 시간대 별로 추출한 total RNA들을 QuantiTect SYBR Green reverse transcription PCR kit(cat. no.204243;Qiagen)에 첨가, Rotor-Gene 2000 Real-Time Cycler machine (Corbett Research, Australia)를 이용하여 측정하였다. 각 유전자의 specific한 primer를 제작하여 최종 볼륨이 25ul가 되도록 kit의 enzyme과 잘 섞은 후, initial denaturation과정은 94 °C에서 2분, denaturation과정은 94 °C에서 30초, annealing과정은 55 °C에서 30초, extention과정은 72 °C에서 45초씩 45cycle을 수행하였다. 제작하여 사용한 primer는 다음과 같다:

$\beta$ -actin gene forward, 5'-GGCCGTTCTGTCCCTCTAC-3';  
reverse, 5'-CAGCTCCGATGGTGATGAC-3',  
peroxidase gene forward, 5'-CTGACATTCTACTAGCCCTTGGTTCT-3';  
reverse, 5'-TCTGCGTTTGGATTATTGTTT TAGG-3',  
*PR1-1a* gene forward, 5'-GGCAGCCCAGACTTCTCAGC-3';  
reverse, 5'-GCATCTCACTTTGGCACATCCTA-3',  
*PAL1* gene forward, 5'-ATAACGGTTTGCCTTCTAATCTT-3';  
reverse, 5'-CATCCTGGTTGTGTTGCTCA-3'),  
*CsGolS2* gene forward, 5'-CAGCAAACCAGACCCAATTT-3';  
reverse, 5'-TCCACTTGGCATTTC AAACA).

#### 마. abiotic stress 처리

*CsGolS2* 유전자의 drought, cold, dark와 같은 abiotic stress 에 대한 발현양상을 알아보기 위해 멸균된 상토에 4주간 오이를 키웠다. 가뭄조건은 매일 관주하여 물을 준 대조구와 달리 일주일간 계속 물을 주지 않음으로서 처리하였고, 저온조건은 암상태의 8°C의 incubator에 3 시간 동안 방치함으로서 처리 (대조구도 동일하게 상온에서 암처리 하였음) 하였으며, 암조건은 생육온도에 맞춰진 암상태의 incubator안에 3 시간 동안 처리하여 유전자 발현여부를 확인하였다.

### 3. 결과 및 고찰

O6균주를 처리한 오이와 O6균을 처리하지 않은 오이에 갈반병균을 접종한 후 total RNA를 분리하여 *CsGolS2* 유전자 probe를 이용하여 northern hybridization을 실시한 결과, O6균주를 처리하지 않고 갈반병균을 접종한 구

에서 24시간째에 *CsGolS2* transcript가 발현되기 시작한 반면, O6균주를 처리하고 갈반병균을 접종한 구에서는 12시간째부터 *CsGolS2* mRNA가 유도되었다 (Fig. 1). 갈반병균을 접종한 오이에서의 real time PCR 결과 northern hybridization의 결과와 동일하게 O6균주를 처리한 구에서 병원균을 접종한 후 12시간 만에 약 6배 정도의 *CsGolS2* transcript가 증가함을 보여 주었고, 같은 정도의 *CsGolS2* transcript가 병원균만을 접종한 구에서는 24시간째에 증가함을 보여 주었다. 한편 증가된 *CsGolS2* transcript는 병원균 접종 후 36시간까지 높은 수준을 유지하였다. 지금까지 전 세계적으로 galactinol synthase 유전자가 병원균의 접종에 의해 유도된다는 보고가 없었는데 *CsGolS2*가 갈반병균의 침입에 의해 비교적 빠른 시간인 24시간 만에 유도되고, O6균주를 접종한 구에서 그 발현이 12시간 정도 빨라진다는 사실은 매우 중요한 의미를 내포하고 있다. 병원균과 식물체의 상호작용에서 식물의 저항성이란 병 저항성에 관련된 유전자들의 발현 시기에 의해 결정될 수 있다. 따라서 본 연구 결과에 의하면 O6균주에 의해 병원균의 침입에 대한 식물의 병 저항성이 유도되는 것은 아마도 *CsGolS2*와 같은 유전자들의 발현이 빨라지면서 식물이 병원균의 침입에 빨리 대응함으로써 나타나는 결과일 가능성을 생각해 볼 수 있다.

세균성 점무늬병균을 접종한 오이에서도 *CsGolS2* 유전자가 O6균에 의해 빠르게 증폭 발현되는지의 여부를 확인하기 위해 O6균을 처리한 오이와 멸균수만을 처리한 오이에 각각 오이 세균성 점무늬병균 *Pseudomonas syringae* pv. *lachymans*을 접종한 후 12시간 간격으로 total RNA를 분리하여 northern hybridization과 real time PCR에 의해 *CsGolS2* 유전자의 발현 양상을 확인하였다. 세균성 점무늬병균 처리에 의한 *CsGolS2* 유전자의 발현 양상도 갈반병균의 처리에 의한 *CsGolS2* 유전자의 발현 양상과 유사하였다. O6균주를 접종한 오이에서 세균성 점무늬병균을 접종한 후 12 시간째에 6 배 - 8 배 정도의 *CsGolS2* 발현이 증가하였고, 24시간까지 높은 발현을 유지하였으나, 36 시간째에는 발현이 다소 감소하는 양상이었다. 그러나 *CsGolS2* 가 갈반병균 처리만으로도 높은 수준으로 유도되는 것과는 달리 세균성 점무늬병균의 처리에서는 병원균 접종 후 12시간과 36시간에 약간 유도되는 수준에 머물렀다 (Fig. 2).

기존 보고에 의하면 *Arabidopsis GolS* 유전자는 식물이 가뭄 등의 abiotic stress을 받을 때 유도되는 유전자로 알려져 있다. 본 연구의 주제는 아니지만 O6균주가 오이와 *Arabidopsis*등을 이용한 실험에서 식물에 가뭄에 대한 내성을 유도하는 능력을 보여주었다 (data not shown). 따라서 본 연구 결과 얻어진 *CsGolS2* 유전자도 가뭄 등의 abiotic stress에 의해서도 유도되는

지를 알아보기 위해 오이에 가뭄, cold shock, dark 등의 stress를 처리한 후 northern hybridization에 의해 *CsGolS2* 유전자의 발현 양상을 확인해 본 결과, 다른 스트레스에는 반응하지 않고 가뭄에 의해서만 specific하게 유도됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 따라서 O6균주에 의한 오이의 갈반병에 대한 저항성 유도 능력과 가뭄 내성 유도 능력은 O6균주에 의해 오이의 *CsGolS2* 유전자의 발현이 빨라져서 나타난 결과일 가능성을 내포하고 있다.

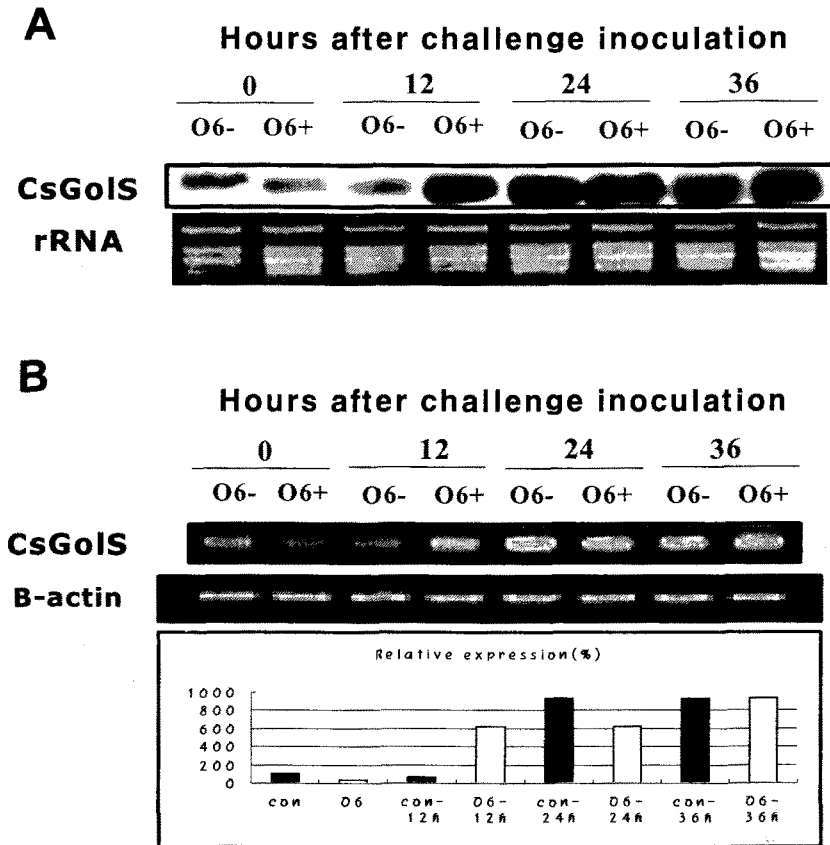


Fig. 1. Northern (A) and real time PCR (B) analyses of the *CsGolS2* gene transcription upon infection by *Corynespora cassicola* in cucumber leaves that were pre-treated with(+) or without(-) *P. chlororaphis* O6.

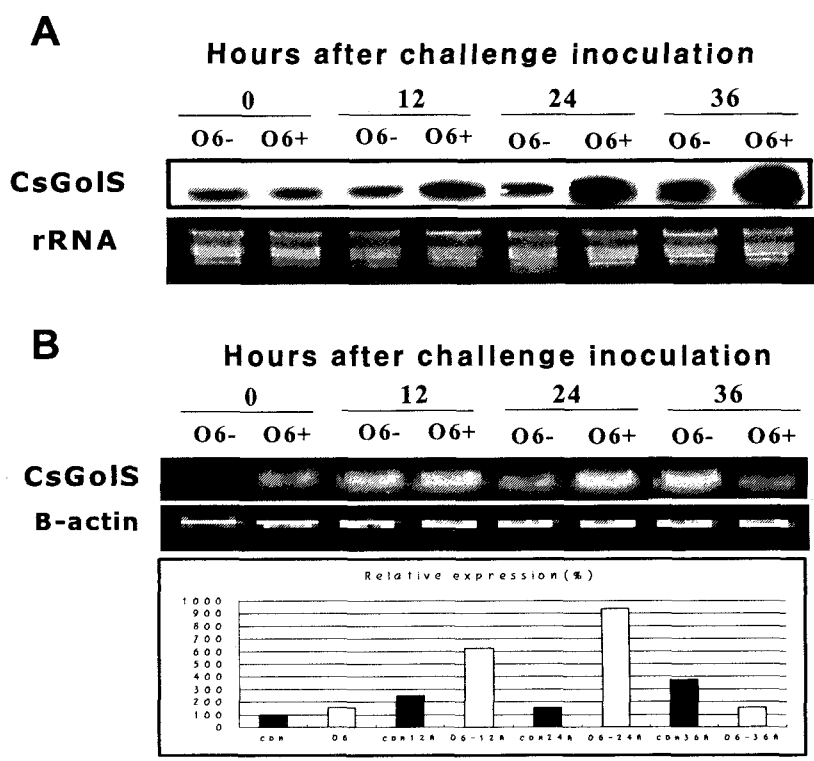


Fig. 2. Northern (A) and real time PCR (B) analyses of the *CsGolS2* gene transcription upon infection by *Pseudomonas syringae* pv. *lachymans* in cucumber leaves that were pre-treated with(+) or without(-) *P. chlororaphis* O6.



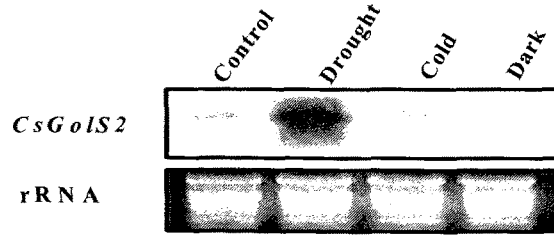


Fig. 3. Induced transcription of the CsGolS2 gene in cucumber leaves upon various biotic stresses such as drought, cold and dark.

O6균주를 처리하고 갈반병균을 접종한 후 시간대별로 total RNA를 분리하여 일반적으로 병원균에 의해 유도되는 전신획득저항성 (systemic acquired resistance, SAR) 관련된 유전자들, 즉 peroxidase (POX), phenylalanine ammonia lyase (PAL), 그리고 pathogenesis-related protein 1a (PR-1a)의 발현 정도를 real time PCR에 의해 확인하였다. PAL transcript는 갈반병을 접종한 후 12시간째에 약 40배 이상이 O6균주 처리에 상관없이 증가한 후 급격히 감소하였고, POX transcript는 병원균 접종 후 12, 24 시간대에 강하게 발현된 후 감소하였으나 O6균주를 접종한 처리구에서 약간 발현량이 많았다. 그러나 PR-1a transcript의 경우는 병원균이 접종된 후 12 시간대부터 O6균주 처리에 의해 그 발현량이 증폭되었고 36시간대 까지 지속적으로 점점 더 증폭발현의 폭은 더 커졌다 (Fig. 4). 이는 O6균에 의한 식물의 병 저항성 발현이 PAL 이나 POX 유전자에 관련된 방어반응과는 무관하며 PR-1a 유전자의 발현과 밀접하게 연관되어 있음을 암시한다. 이러한 사실은 5 mM의 salicylic acid 와 jasmonic acid 및 BABA에 의해서도 유도 발현되는 시간대가 다르기는 하지만 CsGolS2 유전자의 발현이 강하게 유도된다는 사실 (Fig. 5) 과도 잘 일치되고 있다.

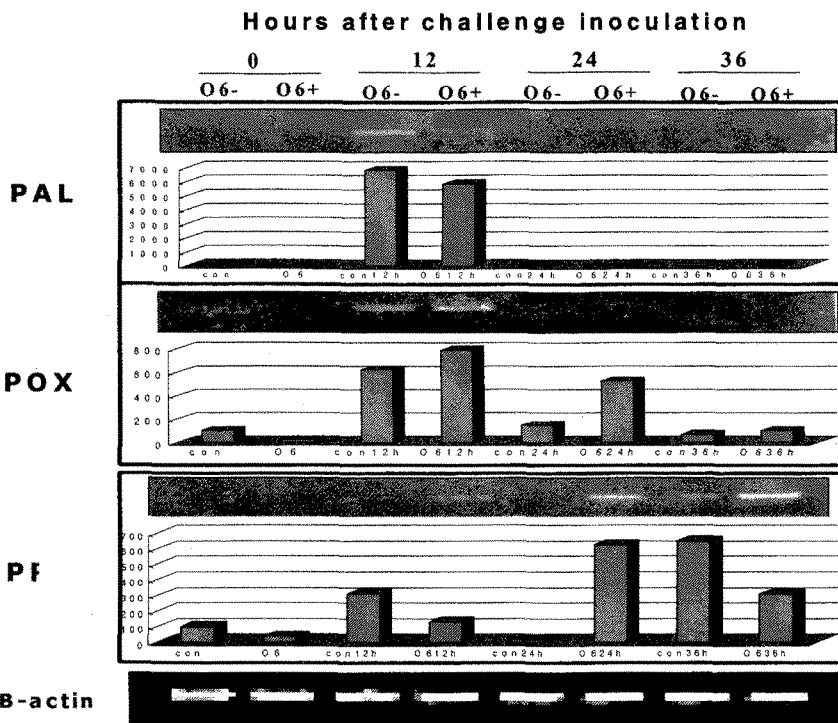


Fig. 4. Real time PCR analysis of transcription of the systemic acquired resistance related genes upon *Corynespora cassicola* infected cucumber plants that were pre-treated with (+) or without (-) *P.chlororaphis* O6.

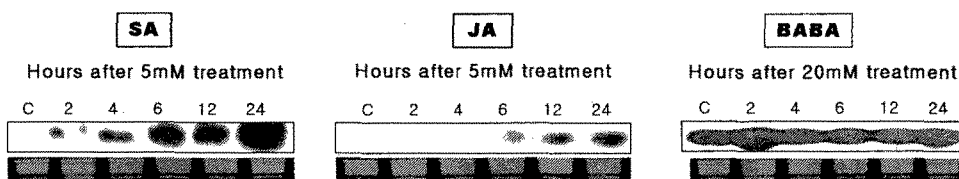


Fig. 5. Induction of the *CsGolS2* gene transcript upon treatments of plant defense activated chemical inducers in cucumber.

# 제 13 절 *Pseudomonas chlororaphis* O6 균주에 의해 유도되는 병 저항성유도 유전자 *CsGolS2*의 형질 전환 및 병 저항성 유도 능력

## 1. 서언

제 11절과 12 절에서 *P. chlororaphis* O6균의 처리에 의해 대조구보다 빠르게 증폭 발현되는 많은 유전자들을 클로닝하였으며 이들의 발현양상을 비교 분석하였다. 이러한 유전자 pool에서 O6균주에 의해 가장 빠르고 강하게 증폭발현이 이루어졌던 *CsGolS2* 유전자가 여러 병저항성에 관련된 SA, BABA등의 처리에서도 유도되고, 갈반병균 뿐만 아니라 세균성 점무늬병균의 처리에 의해서 빠르게 유도되어 *CsGolS2* 유전자가 식물에 병 저항성을 유도하는 가능성이 있음을 시사하였다. 따라서 본 절에서는 *CsGolS2*를 담배에 형질전환하여 병 저항성을 제고하는 기능이 있는지의 여부를 확인하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. *CsGolS2* 유전자의 담배 형질전환

Subtractive hybridization에 의해 획득한 *CsGolS2* 유전자를 담배에 형질전환하기 위하여 pBI121 binary vector (Fig. 1A)를 선택하였다. Full-length *CsGolS2* 유전자를 pBI121 벡터에 삽입하기 위하여 synthetic nucleotide를 제작하여 벡터 후미 multiple cloning site에 *SalI*, *KpnI*, *BamHI* enzyme site를 새로이 창출하였고 이를 pBI121-1으로 명명하였다 (Fig. 1B). *CsGolS2* 유전자를 cloning하기 위해 pBI121-1 벡터는 *XbaI*과 *KpnI* enzyme으로 digestion하여 GUS을 삭제한 다음 *CsGolS2*의 *XbaI*과 *KpnI* site를 각각 첨가한 start codon과 stop codon을 벡터에 접지시킨 후 (Fig. 1C) *E. coli* DH5a에 transformation 하여 cloning여부를 확인하고 *Agrobacterium* LBA4404에 다시 형질전환 하였다.

담배 형질전환을 위하여 MS배지에 wild type인 *Xanthi*의 종자를 표면 살균하여 과중한 후 4-8주간 잎이 5엽 정도 자랄 때까지 키웠다. Binary 벡터가 들어가 있는 *Agrobacterium* LBA4404는 형질전환 하루 전에 배양하여 OD 값을 0.6-0.8로 맞춰 MS 배지에 현탁하였다. 멸균된 petri dish에

*Agrobacterium*을 붓고 clean bench에서 적당한 크기로 자른 담배 잎을 넣어 5-10분간 방치하였다. 멸균된 3MM paper에 *Agrobacterium*에 젖은 담배 잎을 올려놓고 물기를 말린 후에, MS에 NAA와 BAP이 첨가된 배지로 치상하여 암상태의 25 °C incubator에 2일간 두었다. 이를 후에 담배 잎을 shooting induction 배지에 옮겨 callus와 shoot가 나올 때까지 배양하였고 2주 간격으로 계대배양 하였다. Callus에서 조그만 shoot가 나오면 새 배지에 계대하여 충분히 키운 다음, shoot별로 구분하여 잘라 root induction 배지로 옮겼다. Root induction이 확인되면 이를 멸균된 상토에 옮겨 심어주고, 비닐봉지로 100% 습한 상태를 유지하여 활착시킴으로서 형질전환 된 담배를 얻었다.

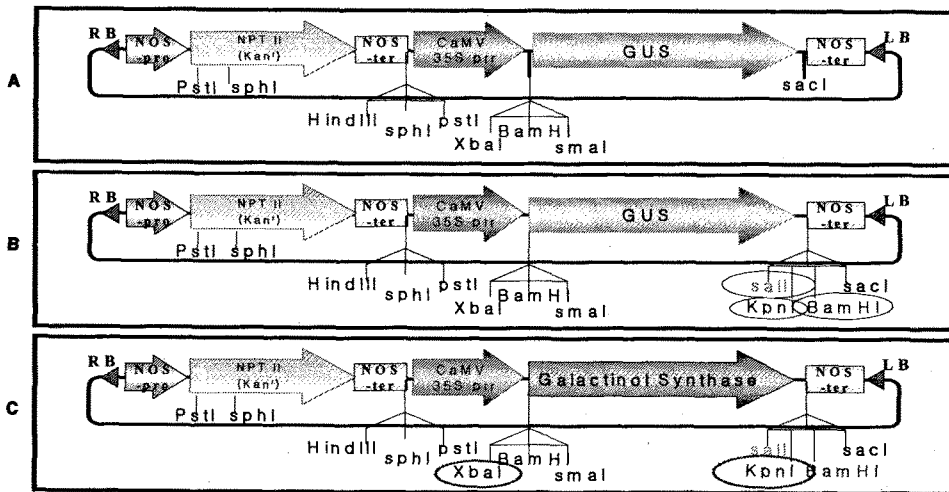


Fig. 1. Binary vector construction for transformation of *CsGolS2* gene to tobacco

#### 나. *CsGolS2* 유전자의 벼 형질전환

오이에서 분리된 *CsGolS2* 유전자를 *Bgl*II site가 있는 forward primer와 *BstE*II site가 있는 reverse primer를 이용하여 PCR생성물을 얻고 이를 동일한 효소(*Bgl*II, *BstE*II)들로 절단하여 1.1kb의 *CsGolS2*를 준비하였다. 이와 같이 준비된 *CsGolS2* 유전자 단편과 동일한 효소들로 절개된

pCAMBIA1201를 ligation 하여 pCAMBIA1201:CsGolS2 cassette를 제조하였다.

동진벼(*Oryza sativa*)의 callus가 *Agrobacterium*을 이용한 벼 형질전환에 이용되었다. 먼저 우량 종자 만을 선별하여 깨지지 않도록 유의하여 종피를 벗겨낸 다음, 70% 에탄올 10mL에 약 30초 동안 표면 살균 후 3차 증류수로 잘 행구어 준 다음 약 50분 동안 10mL의 2% NaOCl에 50분간 침지시켜 살균하였다. 이후 멸균된 증류수 30mL로 약 3-4번 반복해서 세척하였다. 이 종자는 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)가 2 mg/L 함유된 캘루스 유도 배지, 2N6 basal (2N6 basal-N6 salts and vitamin, 5 mg/L Fe<sub>2</sub>EDTA, 300 mg/L casein enzymatic hydrolysate, 500 mg/L proline, 500 mg/L glutamin, 30g/L sucrose, 2 mg/L 2,4-D, 4g/L phytigel, pH 5.8)에 치상하여 암 상태에서 배양하였다. 배양 후 3-4주가 지나면 벼 종자의 배반으로부터 캘루스가 유도되었고 이렇게 배반으로부터 유도된 캘루스를 활성화하여 균주와 공조 배양시키기 위해, 지름이 1-2mm인 둥근 모양의 윤기 있는 캘루스만을 선별하여 같은 배지에서 계대 배양하면서 3-4일 동안 암 상태에서 캘루스를 활성화시켰다.

pCAMBIA1201를 가지고 있는 *A. tumefaciens* LBA4404 균주를 5 $\mu$ g/ml kanamycine과 20  $\mu$ g/ml hygromycin 이 함유된 YEP 배지에서 하루 동안 배양하여 농도가 OD600에서 2.0정도의 탁도로 준비하였다. 균주가 준비되면 3000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 침전된 pellet을 acetosyringone이 함유된 5 ml의 AA-AS (AA macroelement, N6 micro element & vitamin, 5 mg/L Fe<sub>2</sub>EDTA, 1 mg/L 2,4-D, 20g/L sucrose, pH 5.8 and containing 100  $\mu$ M acetosyringone) 배지에 녹였다. 멸균된 petri-dish에 *Agrobacterium*이 포함된 위의 AA-AS 배지를 준비하여 캘루스를 넣고 약 30분간 공조배양 시켰다. 공조배양이 끝나면 멸균된 여과지 위로 옮겨서 물기를 제거한 후 1ml의 AA-AS 배지로 포화시킨 멸균된 여과지가 깔려있는 2N6-AS (2N6-basal (except sucrose) with 10g/L glucose and add acetosyringone (100  $\mu$ M) after autoclaving, 4g/L phytigel, pH5.2) 배지로 공조 배양한 캘루스를 옮겨 암 상태의 28 °C의 incubator내에서 2-3일간 배양하였다.

2-3일간 공조배양을 시키면 캘루스 표면에 *Agrobacterium*이 과다하게 자라는 것을 제거하기 위해 30mL의 cefotaxime water (250 mg/L)가 담겨 있는 삼각플라스크에 캘루스를 옮겨서 3-4회 걸쳐 흔들며 주면서 캘루스 표면을 씻어주었다. 이 캘루스를 멸균된 여과지 위로 옮겨 물기를 제거하고 선발 배지인 2N6-CH (2N6-basal medium with 40 mg/L hygromycin 250 mg/L cefotaxime, 4g/L phytigel, pH 5.2)배지로 옮겨 암 상태에서 배양하였다. 2 주

에 2회 정도 새로운 2N6-CH배지로 옮기면서 살아남은 형질이 전환된 캘루스를 선별하여 재분화 배지인 MS-BN (MS salts & vitamins, 2g/L casmino acid, 20g/L sorbitol, 30g/L sucrose, 2 mg/L BAP, 1 mg/L NAA, 40 mg/L hygromycine, 250 mg/L cefotaxime, 4g/L phytigel, pH 5.8) 배지로 옮겨 재분화시켰다. 약 2주에 한번 씩 새 배지로 옮겨주어 배양 후 약 한 달이 지나면 엽록소가 생성되며 초엽이 다중 분화되었다. 잎이 전개되고 뿌리의 발생이 보이면 그 개체만을 떼어내어 MS-RT (MS salts & vitamins, 2 g/L casmino acid, 20 g/L sorbitol, 30 g/L sucrose, 4 g/L phytigel, pH 5.8)배지로 옮겨 뿌리를 유도시켰다. 약 1주일이 지나 뿌리가 왕성하게 유도되면 각 개체를 원예용 상토와 vermiculite를 1:1로 혼합한 토양을 담은 포트에 이식하여 1주일 정도 순화시킨 후 포장에 이식하였다.

#### 다. 형질전환체의 병 저항성 검정

제 12절에 기술한 방법에 의해 형질전환 식물의 병 저항성 검정을 실시하였다.

### 3. 결과 및 고찰

지금까지의 결과를 종합해 보면 galactinol synthetase (*CsGolS2*) 유전자의 발현이 본 실험에 공시하였던 곰팡이병과 세균병에 대한 식물의 저항성과 관련될 가능성이 높았기 때문에 과연 이 유전자가 식물의 병 저항성과 직접적으로 관련되는지를 확실하게 알아보려고 미국 SALK사에서 시판중인 *Arabidopsis* mutant line을 분양받아 정상 *Arabidopsis* (Col-0)와 이들 mutant line들의 곰팡이 병원균 *Botrytis cinearia* 4709에 대한 저항성 및 감수성 정도를 비교하여 보았다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 galactinol synthetase (*AtGolS2*) 유전자의 3 가지 서로 다른 부위에 각각 T-DNA가 삽입됨으로서 그 유전자의 기능이 상실되었을 것으로 여겨지는 mutant line SALK121059, SALK128044 및 SALK04601를 분양받아 그 종자를 표면 살균하여 MS/Km배지에서 selection과정을 여러 번 거친 후 homoline으로 확인된 *Arabidopsis* 종자를 각각 amplify하여 사용하였다. 각각 다른 위치의 엑손에 T-DNA가 삽입된 3개 line의 *Arabidopsis* mutant를 가지고 *GolS*의 기능이 상실되었을 때 Col-0와 비교하여 병에 대한 감수성이 나타나는지 알아보았다. 여기서 사용한 병원균은 *Arabidopsis* 병 저항성 실험에서 많이 이용되고 있는 곰팡이 병원균 *Botrytis cinearia* 4709이었으며  $2\sim 4\times 10^4$  spores/ml 농도로 각 잎에 접종하였

던 결과, 3개 line 중 SALK121059와 SALK128044, 2개의 line이 Col-0와 비교하였을 때 훨씬 더 병에 잘 걸렸다 (Fig. 3). 이는 GolS 유전자의 발현이 식물의 곰팡이 병에 대한 저항성에 밀접히 연관되어 있음을 강력히 시사하는 결과이다. 한편 SALK04601 line의 경우 대조구와 거의 차이가 없었는데 이는 그림 10에 나타난 바와 같이 T-DNA가 stop codon과 가까워서 이 유전자의 발현에 거의 영향하지 못한 것으로 사료된다.



Fig. 2. T-DNA/Tn insertion site of AtGolS2 located in chromosome 2.

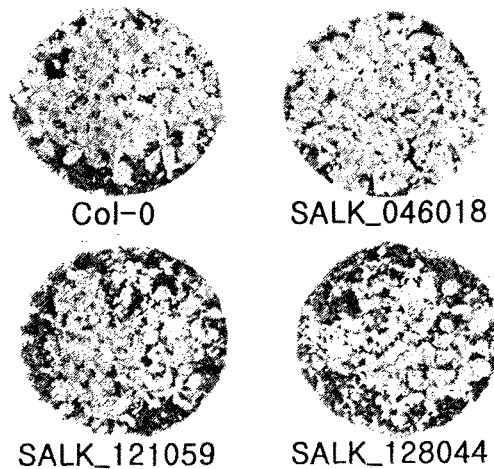


Fig. 3. Disease severity of *Arabidopsis* SALK lines against *Botrytis cinerea*. Col-0: wild-type; SALK\_046018, SALK-121059, SALK\_128044: AtGolS2-deficient lines.

*Arabidopsis* SALK mutant line을 이용하여 *GolS* 유전자의 기능이 상실되면 식물이 곰팡이 병원균에 대해 감수성으로 전환되므로 이 유전자가 병저항성과 밀접하게 관련되어 있다는 사실을 알았기 때문에 *CsGolS2* 유전자의 양쪽 말단에 multiple cloning site를 장착한 primer를 design하여 PCR를 통해 *CsGolS2* 유전자를 증폭한 후 pBII21-1 vector에 cloning하여 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질 전환하였다. 이를 leaf disk 및 particle gun 방법으로 담배와 벼에 각각 형질전환 하였고 각각 kanamycin과 hygromycin이 포함된 배지에서 selection을 통하여 형질 전환 담배 및 벼 T1 line들을 획득하였다. 이들 T1 line들의 genomic DNA를 얻은 후에 PCR 방법으로 형질전환 여부를 확인하였고, Real Time PCR을 이용하여 형질전환된 *CsGolS2* 유전자가 담배에서 잘 발현이 되고 있는지를 확인하였다 (Fig. 4). 현재 형질 전환 담배 및 벼에서 얻은 종자를 다시 MS/km 배지에 파종하여 selection한 후에 담배의 경우는 *Erwinia carotovora*를, 벼의 경우는 도열병균, 흰잎마름병균 및 벼알마름병균 등을 접종하여 wild type 식물과 비교하였을 때 병 저항성이 발현되어 병의 정도가 덜한지를 검정하고 있다. *CsGolS2* 형질 전환 담배의 경우 담배 무름병에 대해 병 저항성이 유도됨을 확인하였다 (Fig. 5) 따라서 *CsGolS*는 새로운 소재의 병 저항성 유도 유전자로서의 가능성을 시사하고 있다.

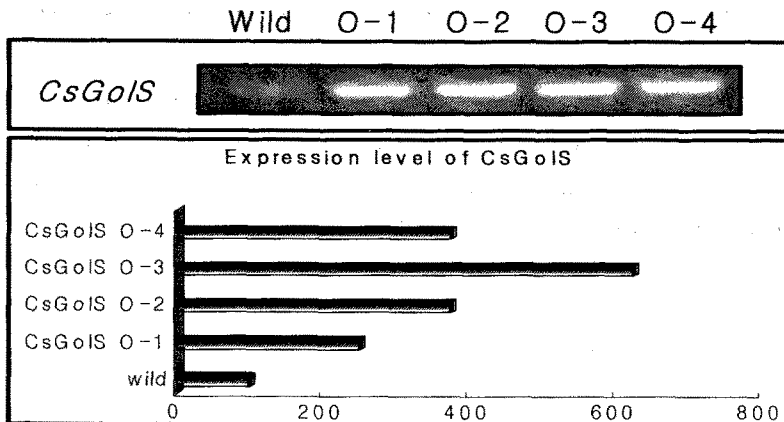


Fig. 4. Expression of *CsGolS2* in tobacco. Transgenic tobacco lines expressed *CsGolS2* were constructed and 4 putative transgenic lines were selected, and determined expression of *CsGolS2* by RT-PCR analysis.



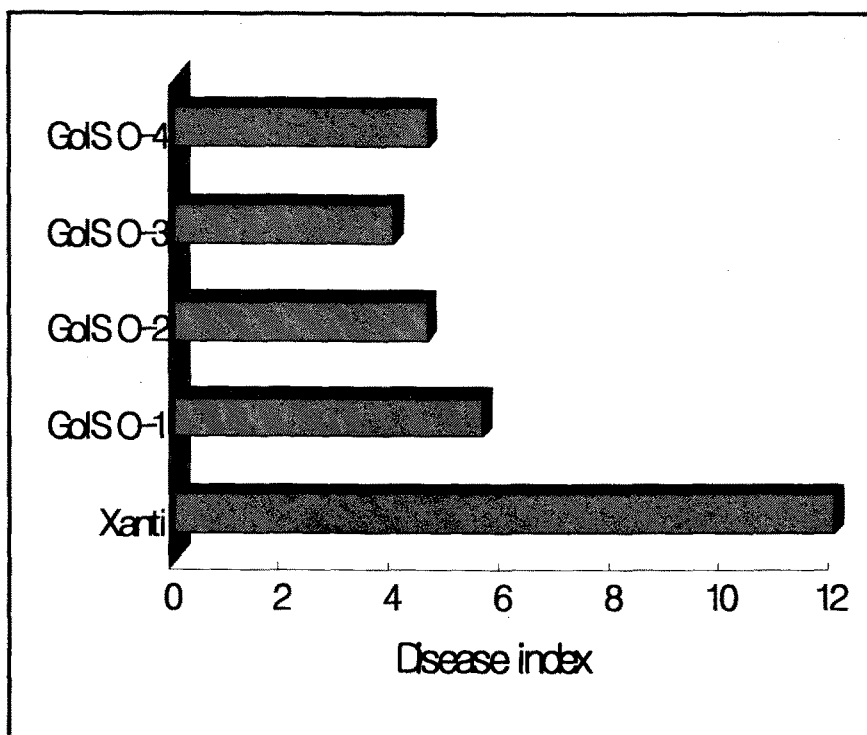


Fig. 5. Induced resistance of *CsGolS2* over expressed lines (GolSO1 - 4) against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SCC1. Same growth period of tobacco plants were inoculated with *E. carotovora*, and measured symptomatic leaves showed soft rot on inoculated leaves.

## 제 14 절 *Pseudomonas chlororaphis* O6의 식물병 저항성 유도에 관련된 microbial determinant 유전자들의 담배에 형질 전환 및 병 저항성 유도 능력

### 1. 서언

*P. chlororaphis* O6를 비롯한 여러 토양 미생물들은 식물의 병 저항성을 유도할 수 있는 미생물 유전자를 소지하고 있다. 그 대표적인 예로 일부 세균은 ACC deaminase를 생산한다. ACC deaminase는 식물의 중요한 신호물질의 하나인 ethylene의 전구물질인 ACC를 가수분해하여 ethylene 생성을 억제하는 효소를 암호화하고 있다. 이러한 ACC deaminase를 생산하는 균주들은 식물에서 ethylene의 농도를 감소시킴으로서 ethylene에 root elongation이 억제되는 효과를 제거함으로써 식물의 생장을 촉진하는 원인이 된다. 또한 식물체에서 만약 ACC를 deamine함으로써 ethylene의 농도를 감소시켜서 식물의 병 저항성에 관련된 신호 전달 체계를 교란시켜 식물병 저항성이 유도될 가능성이 있다.

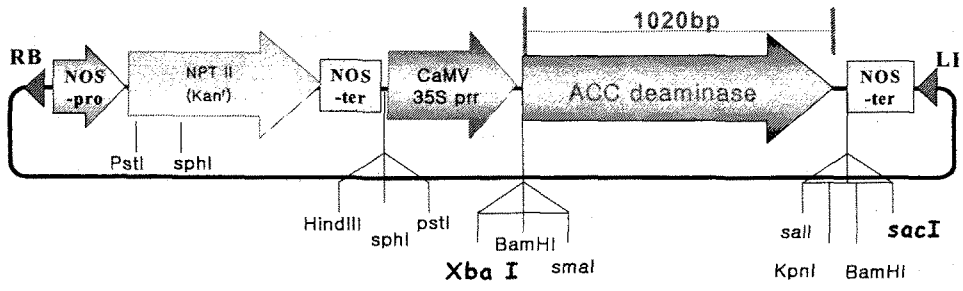
또한 일부 식물세균병균 (무름병균)은 식물에 병을 일으키기 위해서는 식물을 분해하는 효소나 독소를 생산하여 식물의 세포를 파괴하여 식물에 병을 일으킨다. 이런 식물세포에 영향을 주는 병원세균이 생산하는 효소나 독소는 병원균의 밀도가 일정 이상인 조건에서 발현이 된다. 이러한 현상은 quorum sensing이라는 용어로 설명이 가능하다. 이러한 신호물질로 homoserine lactone들이 관여한다고 알려져 있다. 중요한 식물세균병이면서 방제가 어려운 무름병균도 세포벽 분해효소 (pectinase, polygalacturonase)들을 생산하는데 homoserine lactone에 의해서 효소의 생성이 조절된다. 그러나 식물병원세균의 농도가 일정 농도 이상일 때만 식물에 병을 일으킬 수 있다. 따라서 본 절에서는 *P. chlororaphis* O6균주의 homoserine lactone을 만드는 효소를 암호화한 *phzI* 유전자를 담배에 형질전환하여 homoserine lactone을 생산 담배를 조제하여 저 농도로 무름병균을 접종 시 병 저항성이 되는 지 혹은 고농도로 접종 시 감수성이 증진되는 지 등에 대해 조사하였다. 본 절에서 미생물에서 유래한 병 저항성 유래 유전자를 담배에 형질 전환하여 식물체가 병 저항성이 유도되는 지를 확인코저 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. Acc deaminase와 *phzI* 유전자의 담배 형질전환

*P. chlororaphis* O6와 Acc deaminase를 생산하는 C1036균주에서 Acc deaminase와 *phzI* 유전자를 담배에 형질전환하기 위하여 pBI121 binary vector (Fig. 1)를 선택하였다. Full-length 유전자들을 pBI121 벡터에 삽입하기 위하여 synthetic nucleotide를 제작하여 벡터 후미 multiple cloning site에 Sall, KpnI, BamHI enzyme site를 새로이 창출하였고 이를 pBI121-1으로 명명하였다 (제 13절). 각 유전자는 start codon과 stop codon을 가진 full length 유전자를 벡터에 접지시킨 후, *E. coli* cell(DH5a)에 transformation하여 cloning 여부를 확인하고 *Agrobacterium* LBA4404에 다시 형질전환 하였다.

담배 형질전환을 위하여 MS배지에 wild type인 *Xanthi*의 종자를 표면 살균하여 파종한 후 4-8주간 잎이 5엽 정도 자랄 때까지 키웠다. Binary 벡터가 들어가 있는 *Agrobacterium* LBA4404는 형질전환 하루 전에 배양하여 OD 값을 0.6-0.8로 맞춰 MS 배지에 현탁하였다. 멸균된 petri dish에 *Agrobacterium*을 붓고 clean bench에서 적당한 크기로 자른 담배 잎을 넣어 5-10분간 방치하였다. 멸균된 3MM paper에 *Agrobacterium*에 젖은 담배 잎을 올려놓고 물기를 말린 후에, MS에 NAA와 BAP이 첨가된 배지로 치상하여 암상태의 25℃ incubator에 2일간 두었다. 이를 후에 담배 잎을 shooting induction 배지에 옮겨 callus와 shoot가 나올 때까지 배양하였고 2주 간격으로 계대배양 하였다. Callus에서 조그만 shoot가 나오면 새 배지에 계대하여 충분히 키운 다음, shoot별로 구분하여 잘라 root induction 배지로 옮겼다. Root induction이 확인되면 이를 멸균된 상토에 옮겨 심어주고, 비닐봉지로 100% 습한 상태를 유지하여 활착시킴으로서 형질전환 된 담배를 얻었다.



**pBI 121-1 + ACC deaminase gene**

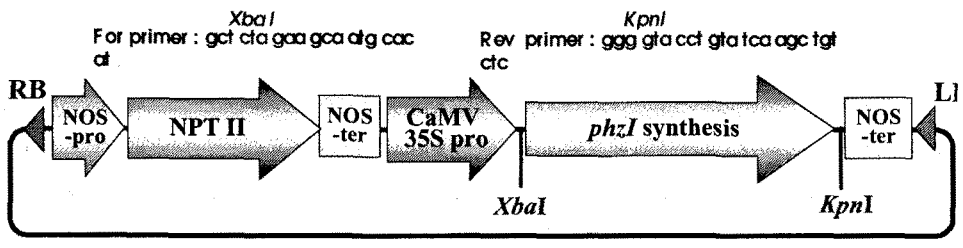


Fig. 1. Binary vector construction for transformation of *phzI* and acc deaminase gene to tobacco

나. 형질전환체의 확인 및 병 저항성 검정 방법

*PhzI*와 *Acc deaminase*가 형질전환된 담배의 형질 전환 유무를 확인하기 위해 T0담배의 잎으로부터 genomic DNA와 total RNA를 분리하여 각 유전자의 specific primer를 조제하여 PCR에 의해 유전자가 삽입되었는지를 확인하였고, 형질 전환 발현 유무는 RT-PCR을 이용하여 유전자의 발현 정도를 조사하였다. 이렇게 하여 최종 선발된 형질전환 담배의 병 저항성 유도 검정은 제 2절에 기술한 방법으로 담배의 무름병 저항성 정도를 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. *PhzI*와 *Acc deaminase* 유전자의 클로닝

*Acc deaminase*를 유전자를 클로닝하기 위해 이미 알려진 *Acc de-*

minase 유전자의 specific primer를 조제하여 PCR방법에 의해 partial Acc deaminase 유전자를 확보한 다음 genomic library를 screenin하여 full length 유전자를 확보하여 클로닝하였다. Acc deaminase 유전자는 1,074bp의 nucleotide로 구성되어 358개의 deduced amino acid로 구성되어 있었고, subunit의 분자량은 39.766 kDa이었으며 theoretical pI는 10.26이었다 (Fig. 2). 또한 deduced amino acid sequence는 이미 보고된 *Pseudomonas*와 *Enterobacter*의 Acc deaminase와 85 %이상의 높은 상동성을 나타내었다 (data not shown).

```

attacacatcgagccctaccttcaatgcccgatcaacttatcaacggagacccgatatg
      M P G S T Y Q R R P D M
aacctgagcaagttcaagcgctaccctctgaccttcggcccctcgcccattaccccacta
N L S K F K R Y P L T F G P S P I T P L
aaacgcctgagtgagcacctggcgcgcaaggtcgagttgtatgccaaagcgcgaggattgc
K R L S E H L G G K V E L Y A K R E D C
aacagcggctcggccttcggcggcgacaagaccgcaaactggaatacctggtgccggaa
N S G L A F G G D K T R K L E Y L V P E
gccatcgacggcggctacgacacgctggtatcgatcggtggcatccagtccaaccagacc
A I D G G Y D T L V S I G G I Q S N Q T
cgtcaggtggcagccgtggcggcgcatctgggcatgaagtgcgtgctggttcaggagaat
R Q V A A V A A H L G M K C V L V Q E N
tgggtcaactattccgacgcggttgtagaccgggtcggcaatatcgagatgtcgcgcatc
W V N Y S D A L Y D R V G N I E M S R I
atgggcgccgatgtgcccctggattcggcaggcttcgatatcggcattcgcggagctgg
M G A D V R L D S A G F D I G I R P S W
gaaaaggccatggccgacgtcgaggaaagcggcggcaagccgttcccattcctgcggggc
E K A M A D V E E S G G K P F P I P A G
tgctcggaacacccttatggcggcctggggttcgtgcgttttgccgatgaagtgcgccag
C S E H P Y G G L G F V R F A D E V R Q
caggaagaagagctgggcttcaaattcgactacattgtggtctgctcggtgaccggcagc
Q E E E L G F K F D Y I V V C S V T G S
actcacgcaggcatgctgggtgggcttcgctgccgatggccgggcacaacgtgtgatcgg
T H A G M L V G F A A D G R A Q R V I G
atcgacgcgtcggcgaaaccggaaaagaccgcgcgaggtcctgcgcatcgctcagaac

```

I D A S A K P E K T R A Q V L R I A Q N  
 actgcaaaaactggtgaagctgggcccgcgaaataaccgccgaagacgtggtgctcgacac  
 T A K T G E A G P R N N R R R R G A R H  
 ccgctacgcctaccgccgaatacggcctgccgaacgatggcacccctcgaagccatccgcct  
 P L R L P G I R P A E R W H P R S H P P  
 ctgcgccccgcctggaaggcgtgctgaccgacccggctctacgaaggcaaattccatgcacgg  
 L R P P G R R A D R P G L R R Q I H A R  
 catgatcgacatggtgcgcaatggcgaattccccgaaggctcgaagtgtctacgccca  
 H D R H G A Q W R I P R R L E S A L R P  
 cctggggcggcgtgccggcgtgaatgcctacagctttctgttcaaggacggttgagccga  
 P G R R A G A E C L Q L S V Q G R L S R  
 aagcgttctctgcagtcgataacacacttcggctgcagtgttcccggctaaaccggaaaat  
 K R S C S R -  
 acttaatcactagt

Fig. 2. Nucleotide and deduced amin acid sequence of ACC deaminase gene of *Pseudomonas* sp.

미생물 유래 *phzI* 유전자와 ACC deaminase 유전자가 식물에서 병저항성을 유도할 것으로 추정되어 각 유전자의 양쪽 말단에 multiple cloning site를 장착한 primer를 design하여 PCR를 통해 각 유전자를 증폭한 후 pBII21-1 vector에 cloning하여 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질 전환하였다. 이들 leaf disk 방법으로 담배에 각각 형질전환 하였고 각각 kanamycin이 포함된 배지에서 selection을 통하여 형질 전환 담배 line들을 획득하였다. 이들 T1 line들의 genomic DNA를 얻은 후에 PCR 방법으로 형질전환 여부를 확인하였고, Real Time PCR을 이용하여 형질전환된 *CsGols2* 유전자가 담배에서 잘 발현이 되고 있는지를 확인하였다 (Fig. 3 and Fig. 4). 현재 형질 전환 담배에서 얻은 종자를 다시 MS/km 배지에 파종하여 selection한 후에 담배의 경우는 *Erwinia carotovora*를 접종하여 wild type 식물과 비교하였을 때 병 저항성이 발현되어 병의 정도가 덜한지를 검정하고 있다.

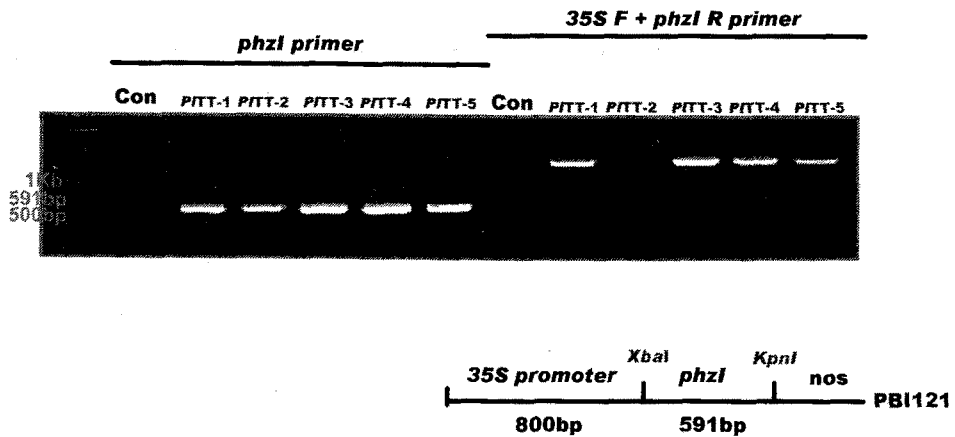


Fig. 3. Transformation of *phzI* gene in tobacco. Transgenic tobacco lines transformed *phzI* were constructed and 5 putative transgenic lines were selected, and determined insertion of *phzI* by PCR analysis with the *phzI* specific primer.

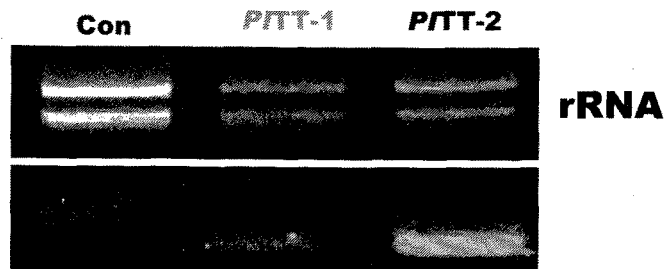


Fig. 4. Expression of *phzI* gene in tobacco. Transgenic tobacco lines expressed *phzI* were constructed and 2 putative transgenic lines were selected, and determined expression of *phzI* by RT-PCR analysis with *phzI* specific primer.

# 제 15 절 *P. chlororaphis* O6균의 제제화 및 실용화 실증 시험

## I. 서 언

본 연구에서 밝혀진 바에 의하면, *P. chlororaphis* O6 균주는 phenazine, HCN, protease, siderophore 등과 같은 여러 가지 식물병원균의 생육억제에 관련된 물질을 생산할 뿐만 아니라, 식물로 하여금 병 저항성이 유도되게끔 활성화시키는 능력을 가진 여러 종류의 식물에서 뿌리 정착 능력이 뛰어난 미생물제제로서의 가능성이 높은 균주이다. 따라서 본 절에서는 생물적 방제제로서 여러 가지 유용한 형질을 지니고 있는 *P. chlororaphis* O6 균주를 미생물제제로 조제하여 실용화하기 위해 유기산을 주 탄소원으로 하여 formulation하여 여러 가지 포장 실증 연구를 통해 미생물 농약으로 가능성을 검토해 보고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. *P. chlororaphis* O6의 제제화

*P. chlororaphis* O6균주의 실용화를 위해 먼저 10 L fermenter에 1/2 LB broth에 0.2% 유기산이 첨가된 배지를 채운 후, O6균주를 접종하여 48시간 동안 생육시킨 후, 포장 실증 실험에 사용하였다. 포장 실증 실험을 위해서는 위에서 생육시킨 O6균을 1%의 당밀과 설탕이 첨가된 물에 증식시켜 토양 관주에 사용하였다.

### 나. 포장 실증 시험

제제화된 O6균주를 2002년 광주시 하우스에서 고추 청고병이 든 포장에 15일 간격으로 관주하였고, 대조구로는 물만 관주한 구를 설정하여 청고병의 발병양을 조사하였다. 또한 다른 멜론과 딸기 하우스 재배 농가에서도 식물병 예방제로서 O6에 대한 방제 효과를 검정하였고, 토양 내의 지렁이의 수를 조사하여 환경에 대한 영향을 간접적으로 조사하였다.



### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 식물생장촉진미생물에 의한 식물 병 저항성 유도과 가뭄 내성 유도

본 연구에서 분리된 *P. chlororaphis* O6균주는 제제화하여 오팜-가드<sup>TM</sup> 라는 상표로 주식회사 식물보호기술에 기술 이전을 실시하여 2002년부터 실제 식물병예방제로 시판되고 있다 (Fig. 1). 오팜-가드는 미생물제제로서 항생제를 내는 미생물을 원제로 하여 개발한 제품으로 토양 연작 병원균의 증식을 억제한다. 뿌리에 처리하는 미생물제제이나 전신 유도 저항성에 의해 지상부의 곰팡이병이나 세균병을 억제하는 능력이 뛰어나다. 또한 시안화수소라는 일종의 독소를 생산하여 선충 밀도를 감소시키는 능력도 가지고 있다. 종자 침지 및 코팅을 하게 되면 감염된 균들을 미리 예방할 수 있다.

오팜-가드를 이용하여 2002년에 광주광역시 남구 승촌동 김옥자 씨 하우스의 청고병 (풋마름병)이 심하게 든 하우스에서 그 효과를 확인하였다. 고추가 청고병으로 죽어가고 있는 하우스에 오팜 가드를 3회 이상 5일 또는 10일 간격으로 처리하였을 때, 이미 걸린 이병주만 죽고 청고병이 옆으로 전염되는 증상이 멈추었다. 그러나 처리를 하지 않은 부분은 청고병이 지속적으로 옆으로 번지면서 시들어서 죽었다(그림 11).

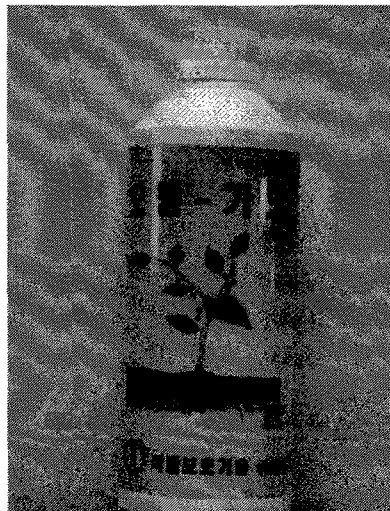


그림 1. *P. chlororaphis* O6균주의 제제화 (오팜-가드)

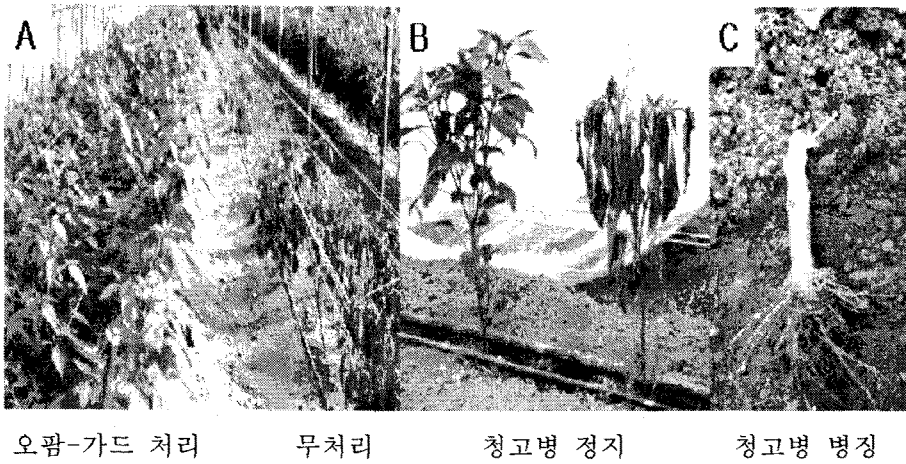
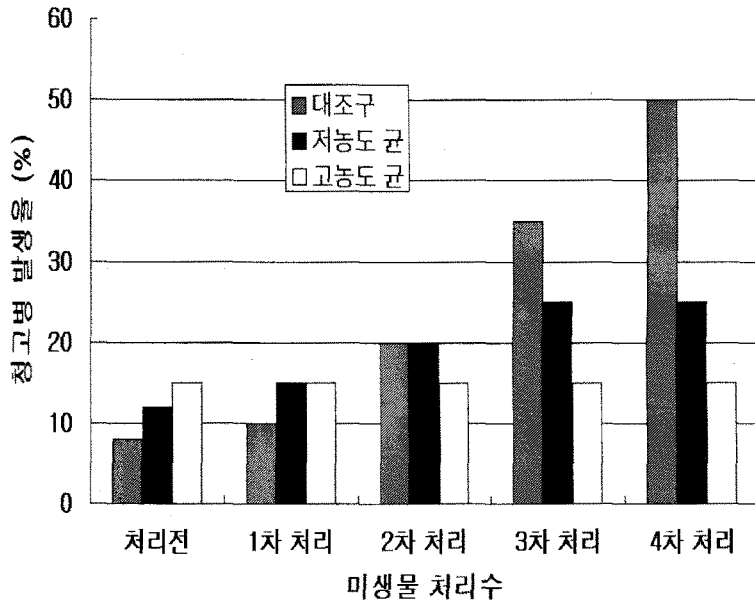


그림 2. 오팜-가드 처리에 의한 고추 청고병 방제 효과

같은 해에 전남 담양군 허준 씨 멜론 하우스에서의 오팜-가드의 효과를 확인하였다. 발아된 종자를 육묘시기부터 15일 간격으로 오팜-가드를 관주하여 수확하기 2주 전까지 처리하였을 때 처리하지 않은 곳보다 병이 50 - 70 % 이상 적게 발생하였으며, 특히 장마시기였던 7월 말부터 8월 중까지 15일 이상 비가 오거나 흐린 날씨에도 불구하고 네트가 아물지 않아 뽑아 없앤 것 외에는 병에 걸려 죽은 것은 없었다. 또한 오팜-가드를 처리한 토양내에서 평방미터당 40 - 50 마리의 지렁이가 살고 있었다. 이는 오팜-가드가 환경에는 큰 영향을 주지 않고 병 발생을 억제하는 효과가 탁월함을 나타내는 결과이다. 결국 장마로 인해 열매가 작기는 했지만 시세가 좋아 수출용으로 판매 이익을 얻었다 (그림 3)



그림 3. 오팜 가드 처리에 의한 멜론의 병 방제 효과와 환경 친화효과.  
 가. 오팜-가드를 토양 관주한 멜론 시설 나. 처리하지 않은 멜론 시설 대조구  
 다. 오팜-가드 처리구에서의 지렁이 관찰 라. 오팜-가드 처리구에서 멜론 수확

오팜-가드는 최근 일부 오이 재배 단지에서 문제가 되고 있는 갈반병에도 탁월한 효과가 있었다. 병이 드는 양을 감소시킬 뿐만 아니라 갈반병이 침입하더라도 더 이상 진전이 되지 않게 멈추어 주는 효과가 있었다 (그림 4).

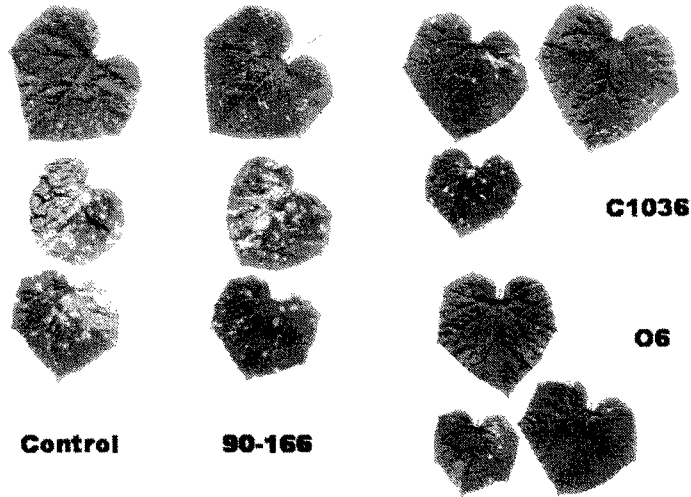


그림 4. 오팜-가드 처리에 의한 오이 갈반병 방제

오팜-가드는 식물 병으로부터 식물이 살아남도록 도와주는 역할을 하는 예방제로서의 역할이 탁월함으로 미리 이런 미생물제제를 반복적으로 토양에 관주하는 것이 확실한 효과를 볼 수 있는 환경친화적인 미생물제제이다. 또한 이미 병이 들었더라도 청고병의 경우에는 더 이상 병이 새로운 건전 고추에 전염되는 것을 막아주는 역할을 하는 미생물제제이다. 이러한 미생물제제의 확실한 효과를 보기 위해서는 종자를 심을 때부터 이러한 미생물제제를 지속적으로 관주함으로써 병이 발병하는 것을 예방할 수 있는 일종의 예방제로서 사용이 권장된다.

여 백

## 제4장 목표달성도와 관련분야에서의 기여도

여 백

## 제 1 절 목표 달성도

연차별 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 목표 달성도를 아래의 1항, 2항, 3항에 나타냈다. 연차별 연구개발 목표들은 대체적으로 연구 계획서의 진도와 일치하여 달성되었으며, 연구의 최종 목표 달성도 역시 3항에 나타낸 바와 같이 계획서의 최종목표를 충분히 달성하였다고 생각된다.

### 1. 제 1 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평가		목표 달성도 (%)	참조부분 (제 2 장)
	평가의 착안점	평가의 척도 (%)		
1. 병저항성 유도 능력이 상실된 rhizobacteria 돌연변이주의 선발 및 특성분석	1. Rhizobacteria의 병저항성 유도 돌연변이주의 선발 및 Tn5 삽입 부위 확인	25	100	제 2 절
	2. Rhizobacteria에 의해 유도되는 식물의 병저항성 유전자의 클로닝 및 발현 양상 확인	25	100	제 11 절
2. 작물에서 rhizobacteria 접종에 의해 유도발현되는 유전자의 클로닝 및 특성 분석	3. 작물의 뿌리 분비액 조성 조사	25	100	제 8 절
3. 식물의 뿌리 분비액 조성 비교 및 rhizobacteria의 뿌리 분비액 이용에 관련된 돌연변이주 선발과 특성 분석	4. Rhizobacteria 뿌리 분비액 이용 이상 돌연변이주 선발 및 Tn5 삽입 부위 확인	25	100	제 8 절



2. 제 2 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평가		목표 달성도 (%)	참조부분 (제 2 장)
	평가의 착안점	평가의 척도 (%)		
1. Rhizobacteria의 병저항성 유도 인자 유전자와 뿌리 분비액 이용 유전자의 클로닝 및 발현조절 기작 확립	1. Rhizobacteria의 유도 저항성 결정인자의 클로닝 및 유전자 발현분석	25	100	제 3, 4, 6, 7 절
	2. Rhizobacteria와 병원균 접촉에 의해 유도되는 병 저항성 유전자의 클로닝 및 발현양상 확인	50	100	제 11, 12 절
	3. Rhizobacteria의 뿌리 분비액 이용에 관련된 유전자의 클로닝 및 유전자 발현 분석	25	100	제 8, 9, 10 절
2. Rhizobacteria와 각종 병원균 접촉에 의해 유도되는 작물의 병저항성 유전자 클로닝 및 특성분석				

### 3. 제 3 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평가		목표 달성도 (%)	참조부분 (제 2 장)
	평가의 착안점	평가의 척도 (%)		
1. 병 저항성 유도 유전자의 실용화 및 담배형질전환과 rhizobacteria의 식물 정착 향상에 관련된 유전자와 물질을 이용한 미생물 제제화	1. 병저항성 결정인자의 결정인자가 도입된 새로운 rhizobacteria의 생산	25	100	제 6, 7 절
	2. 병 저항성 유도인자 유전자의 담배 형질 전환	25	100	제 14 절
	3. 병저항성 유전자들의 담배형질전환 및 병 저항성 유도 검정	25	100	제 13 절
	4. 뿌리 분비액중 병 저항성 결정인자의 발현을 촉진하는 물질의 실용화	25	100	제 10, 15절
2. 병 저항성 유도 유전자가 도입된 형질전환 담배의 생산 및 병저항성 검정				

### 4. 최종 평가의 착안점 및 목표 달성도

평가의 착안점	평가		참조부분 (제 2 장)
	평가의 척도 (%)	목표 달성도 (%)	
1. 고기능 rhizobacteria와 뿌리 분비액의 물질을 혼합한 실용화	30	100	제 8, 10, 15 절
2. 병 저항성 결정인자의 제제화	20	100	제 6, 7, 15 절
3. 병 저항성 유도 유전자들의 식물체내에서의 역할 규명 및 형질전환체 생산	50	100	제 11, 12, 13, 14 절

## 제 2 절 관련 분야에의 기여도

토양에 서식하고 있는 일부 미생물들은 친환경 식물병 방제에 있어서 중요한 자원으로 활용될 수 있는 무궁무진한 source이다. 하지만 아직까지 이런 분야에 대한 연구가 아직까지는 미비하고 활용도가 낮다. 단지 토양에서 성능 좋은 미생물을 분리하여 단순하게 제제화하여 아직 입증되지 않은 미생물제제들이 난립하고 있는 것이 현실이다. 본 연구에서는 1) 생물적 방제 능력이 우수한 *P. chlororaphis* O6균주를 사용하여 식물병 저항성 bioassay 시스템을 정립하였고, 2) O6균의 내병성 유도 능력이 어떠한 신호전달체계에 의해서 발현되는 지 혹은 이러한 신호 전달체계에 의해서 다른 생물적 방제에 관련된 항생물질이나 효소의 생산에는 어떠한 영향을 미치는 등에 대한 구체적인 자료를 제시하였다. 이러한 연구결과는 앞으로 이러한 미생물의 내병성 유도 물질을 대량생산하거나 내병성 유도와 관련된 정보를 얻는데 아주 중요한 자료로 활용될 것이다. 또한 3) 이러한 우수한 O6균주의 실용화를 위한 기초 자료로 오이 뿌리 분비액 조성과 이들 뿌리 분비액 이용에 관련된 유전자를 탐색함으로써 오이 뿌리 정착에 필수적인 유전자들을 밝혔다. 4) 이러한 정보를 토대로 *P. chlororaphis* O6균주를 제제화하여 포장 실증 연구를 통해 식물병 방제 효과 뿐만 아니라 예방 효과가 뛰어난 것을 확인하였다. 5) O6균주에 의해서 유도되는 식물의 유전자를 다수 확보하여 이들의 기능을 알아보기 위해 이들 유도 유전자들은 병원균의 침입 시 유도 발현이 빠르게 유도되도록 O6균이 식물을 priming 상태로 만드는 것으로 추정하였다. 또한 이들 유전자의 기능을 알아보기 위해 유도 유전자의 기능이 소실된 식물 line들을 이용하여 병 저항성 정도를 조사해 본 결과, 식물병에 대한 감수성이 증가하는 것으로 보아 이들 유전자들이 병 저항성 중요한 요인으로 작용하고 있고, 또한 이들 유전자들을 담배에 과대 발현시켜 식물병 저항성을 검정하는 연구가 지속적으로 진행 중이다.

식물과 미생물의 상호작용에서 미생물에 의해 유도되는 식물병 저항성에 관한 연구는 세계적으로 몇 몇 그룹이 진행 중이어서 아직까지는 알려지지 않은 부분이 많아 본 연구 결과는 친환경 농업을 수행하는데 필수적인 자재인 친환경 미생물제제에 대한 많은 정보를 제공하여 앞으로 미생물제제에 대한 연구의 초석이 되었고, 한 단계 연구와 실용화에 대한 결과를 발전시킨 연구 결과로서 친환경 병방제제인 미생물제제에 대한 연구를 극대화시킬 수 있는 확대 연구가 가능할 것으로 사료된다.

## 1. 기술적 측면에서의 기여도

본 연구를 통해 개발된 *P. chlororaphis* O6의 오팜-가드는 제 15 절에서 기술한 바와 같이 여러 식물병을 방제하는 능력이 탁월한 미생물제제이다. 미생물을 제제화할 때 뿌리 분비액과 정착 능력에 관련된 연구 결과를 활용하여 유기산을 첨가하여 O6균주의 능력을 최대한 발휘할 수 있도록 하였다. 또한 O6균주가 가지고 있는 병저항성 유도 능력을 지닐 것으로 추정되는 homoserine lactone synthase (*phzI*)와 ACC deaminase 유전자를 담배에서 과다 발현시켜 병 저항성 유도 능력을 검정하고 있고, O6균주에 의해 특이적으로 발현되는 *CsGolS2* 유전자를 비롯한 몇 개의 유전자를 over-expression하여 병 저항성 유도 능력을 담배를 이용하여 검정 중이다.

본 연구에 의해 여러 유용형질을 지닌 *P. chlororaphis* O6균주를 선발하였고, 제제화하여 실제 포장에서 식물병 저항성 유도 능력을 검정하여 고추 청고병, 호박 모잘록병, 멜론, 딸기, 오이 등에서 식물병 예방제의 가능성을 보여 주었다. 앞으로 제제화된 *P. chlororaphis* O6균주를 이용한 광범위 식물병 저항성 유도 기술은 다양한 종류의 경제 작물에 응용되어 확대 사용될 수 있는 가능성을 열었다고 판단된다.

## 2. 학문발전에의 기여도

본 연구는 아직까지는 미개척 분야인 미생물에 의한 식물병 저항성 유도에 관한 연구로 구체적인 미생물인자 발현 기구 및 식물에서의 미생물에 의해 유도되는 유전자들에 대한 많은 정보를 제공하였다. 따라서 본 연구는 작물학, 미생물학, 분자생물학, 식물병리학 분야의 발전에 기여했다고 판단된다. 본 연구의 결과는 다음과 같이 학술지나 학술대회에서 발표되었다.

### 가. 학술지 (SCI급)

- 1) Mi Seong Kim, Young Cheol Kim, and Baik Ho Cho. 2004. Gene expression analysis in cucumber leaves primed by root colonization with *Pseudomonas chlororaphis* O6 upon challenge-inoculation with *Corynespora cassiicola*. Plant Biology 6; 105-108.
- 2) Beom Ryong Kang, Baik Ho Cho, Anne J. Anderson, and Young Cheol

Kim. 2004. The global regulator GacS of a biocontrol bacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6 regulates transcription from the *rpoS* gene encoding a stationary-phase sigma factor and affects survival in oxidative stress. *Gene* 325; 137-143.

3) Hyo Song Nam, Matt Spencer, Anne J. Anderson, Baik Ho Cho, and Young Cheol Kim. 2003. Transcriptional regulation and mutational analysis of a *dctA* gene encoding an organic acid transporter protein from *Pseudomonas chlororaphis* O6. *Gene* 323; 125-131.

4) Matthew Spencer, Choong-Min Ryu, Kwang-Yeol Yang, Young Cheol Kim, Joseph W. Kloepper, and Anne J. Anderson. 2003. Induced defence in tobacco by *Pseudomonas chlororaphis* strain O6 involves at least the ethylene pathway. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63; 27-34.

#### 나. 학술 발표

1) Young Cheol Kim, and Anne J. Anderson. 2001. Cloning and mutational analysis of a gene, *dctA*, encoding a dicarboxylic acid transporter protein from a biological control bacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6. APS annual meeting abstract book. Salt Lake, USA, *Phytopathology* 91 ; S48.

2) Young Cheol Kim, Ki Young Seong, and Anne J. Anderson. 2001. Sensor kinase GacS regulates production of quorum sensing factors, secondary metabolites, and root colonization in *Pseudomonas chlororaphis* O6. APS annual meeting abstract book. Salt Lake, USA, *Phytopathology* 91 ; S49.

3) Beom Ryong Kang, Baik Ho Cho, and Young Cheol Kim. 2002. Characterization of *Pseudomonas chlororaphis* O6 Tn5 mutants involved in production of secondary metabolites. 한국식물병리학회 초록집, *The Plant Pathology Journal* 18; 346.

4) L. L. R. Marques, Anne J. Anderson, Baik Ho Cho, and Young Cheol

Kim. 2002. A sensor kinase (GacS) of *Pseudomonas chlororaphis* O6 is involved in biofilm formation. 한국식물병리학회 초록집, The Plant Pathology Journal 18; 348.

5) Hyo Song Nam, Jun Kim, Baik Ho Cho, and Young Cheol Kim. 2002. Transcriptional regulation and mutational analysis of the aerobic C4-dicarboxylate transporter (*dctA*) gene of *Pseudomonas chlororaphis* O6. 한국식물병리학회 초록집, The Plant Pathology Journal 18; 353.

6) Song Hee Han, Kil Yong Kim, Baik Ho Cho, and Young Cheol Kim. 2002. Isolation of *Pseudomonas chlororaphis* O6 mutants altered in growth on cucumber root exudates. 한국식물병리학회 초록집, The Plant Pathology Journal 18; 354.

7) Anne J. Anderson, Kwang Yeol Yang, Choon-Min Ryu, Baik Ho Cho, and Young Cheol Kim. 2002. *Pseudomonas chlororaphis* O6 induces plant disease resistance by activating ethylene-dependent signal pathway. 한국식물병리학회 초록집, The Plant Pathology Journal 18; 364.

8) Beom Ryong Kang, Kwang Yeol Yang, Baik Ho Cho, and Young Cheol Kim. 2002. A sensor kinase *gacS* gene of *Pseudomonas chlororaphis* O6 involved in induced systemic resistance against abiotic and biotic stresses, but not in root colonization and oxidative stress. 한국식물병리학회 초록집, The Plant Pathology Journal 18; 365.

9) Mi Seong Kim, Young Cheol Kim, and Baik Ho Cho. 2002. Identification of cucumber genes involved in induced systemic resistance by root colonization of a nonpathogenic rhizobacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6. 한국식물병리학회 초록집, The Plant Pathology Journal 18; 365.

10) Beom Ryong Kang, Jung Hoon Lee, Hyun Jung Kim, Baik Ho Cho, and Young Cheol Kim. 2003. A two-component sensor kinase (GacS) mediated signal transduction pathway involved in production of antifungal compounds in *Pseudomonas chlororaphis* O6. 한국식물병리학회 초록집, The Plant

Pathology Journal 19; 321.

11) Hyo Song Nam, Baik Ho Cho, and Young Cheol Kim. 2003. Transcriptional regulation and mutational analysis of a *dctA* encoding organic acid transporter protein form *Pseudomonas chlororaphis* O6. 한국식물병리학회 초록집, The Plant Pathology Journal 19; 321.

12) Beom Ryong Kang, Baik Ho Cho, and Young Cheol Kim. 2003. The global regulator GacS of a biological bacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6 regulates expression of the stationary-phase sigma factor *rpoS* and reduces survival in oxidative stress. 한국식물병리학회 초록집, The Plant Pathology Journal 19; 321.

13) Song Hee Han, Baik Ho Cho, and Young Cheol Kim. 2003. Isolation and characterization of induced disease resistance (ISR)-deficient mutants of a biocontrol bacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6. 한국식물병리학회 초록집, The Plant Pathology Journal 19; 321.

14) Song Hee Han, Baik Ho Cho, and Young Cheol Kim. 2003. Bacterial determinants involved in the induction of systemic resistance and plant growth promotion in tobacco by *Pseudomonas chlororaphis* O6. 한국식물병리학회 초록집, The Plant Pathology Journal 19; 322.

### 3. 경제, 산업적 측면에의 기여도

본 연구의 산업적 효용가치를 고려하여 다음과 같이 특허를 출원하였고, 오팜-가드라는 상표명으로 주식회사 식물보호기술에 기술이전을 하여 산업화하였고, 영농기술 자료로 활용 중이다.

1) 김영철. 슈도모나스 크로로라피스 O6 균주 및 이를 이용한 식물병 방제 및 가뭄 피해 감소 방법. 출원번호 : 10-2003-0062692. 대한민국 특허청. 2003. 09. 08

2) 주식회사 식물보호기술. 상표명- 오팜-가드

3) 특화겸임연구관, 오이사업단에 영농기술 자료로 활용 중

4) 전남대학교 최고경영자반, 시설채소반과 친환경 유기 농법반에서 강의 자료로 본 연구 과제가 활용되고 있음.



# 여 백

## 제5장 연구개발결과의 활용계획

여 백

## 제 1 절 추가 연구의 필요성

### 1. 다른 작물에의 응용에 관한 추가 연구의 필요성

3 년으로 계획된 본 연구가 성공적으로 이루어져 많은 식물병 저항성 관련 신소재나 유전자등이 개발되었다. 지금까지의 연구 결과로 볼 때, 본 연구는 새로운 미생물에 의한 식물병 저항성 유도에 대한 결과를 도출해 냈고, 새로운 소재의 병저항성 유전자를 확보하였다. 또한 본 연구에서 사용한 *P. chlororaphis* O6 균주를 제제화하여 포장에서 실증 실험을 진행 중이다. 그러나 이러한 신소재나 유전자의 기능연구가 주로 담배를 이용하여 green house 조건하에서 수행되었다. 따라서 본 연구에서 분리된 미생물 유래 유용 유전자나 병 저항성 유도 관련 유전자들을 다른 작물에 형질전환하여 이용하는 연구를 3년에 걸친 추가 연구를 통해 시도해 보고 싶다. 실제로 현재 일부 유용 유전자들은 벼에 형질전환하여 벼 도열병, 세균병 벼알 마름병, 흰잎마름병등에 대한 저항성 벼를 만들려고 노력 중이다.

### 2. 포장 실험으로 확대의 필요성

본 연구에서 얻어진 형질전환 담배나 벼의 병 저항성은 실험실과 온실 단위에서 이루어진 결과이고, 또한 제제화된 오팜-가드도 일부 지역에서 일부 작물 및 일부 병해에 대한 병 저항성 유도 능력에만 국한되었으므로 이들을 농업 현장에서 이용하기 위해서는 좀 더 광범위한 포장 실험이 필수적이다. 따라서 오팜-가드는 좀 더 많은 작물과 병해에 대해 3년 정도의 포장 실험을 수행해야 할 것으로 사료된다.

## 제 2 절 타 연구에의 응용

### 1. O6에 관련된 내병성 유도 미생물의 유도 물질 및 식물병 저항성 유도 유전자의 다른 연구에의 응용

본 연구에서 분리된 *P. chlororaphis* O6균주의 여러 global regular들은 다른 그램 음성균에서도 target유전자가 비슷하겠으며, 비슷한 방법으로 조절될 것으로 추정된다. 따라서 본 연구에서 밝혀진 O6에서의 신호전달 체계는 다른 미생물에서도 응용하여 연구할 수 있어 파급효과가 클 것으로 생각된다. 또한 O6에 의해 유도된 오이의 유전자들도 담배나 *Arabidopsis*와 같은 모델식물을 이용하여 O6에 의해 특이적으로 발현되는 유전자의 기능을 밝히는 아주 중요한 재료가 될 것이다.

### 2. O6균주의 식물생장 조절을 다른 연구에 응용

*P. chlororaphis* O6 균주는 담배의 성장을 촉진하는 물질을 생산할 뿐만 아니라 보리와 벼에 대해서는 생육을 억제하는 물질도 생성하는 이중성을 가지고 있는 균주이다. 이러한 물질을 동정하고 이들 물질들이 어떻게 식물의 성장을 촉진하거나 억제하는 지 등에 대한 연구를 수행하여 새로운 종류의 식물생장 조절 물질의 동정을 기대해 본다.

## 제 3 절 기업화 추진 방향

앞으로 지속적으로 많은 작물과 병에 대한 포장 실증 실험을 통해서 오팜-가드의 식물병 방제 가능성에 대한 연구를 수행하고, 또한 식물병 저항성 유도 물질을 동정하는 연구를 수행하고 또한 이들 물질을 과대 발현하는 연구를 수행하여 제제화하는 연구를 지속적으로 추진할 것이다. 또한 오팜-가드의 기능을 증진시키기 위해 병 방어 활성제로 알려진 SA, BABA, chitosan 등과의 혼합 그리고 다른 그룹의 유용미생물을 분리하여 (예를 들어 phosphate-solubilizing microorganisms) 혼합하여 제제화하는 등 다각적인 방법으로 다양한 종류의 효과를 극대화한 오팜-가드를 만들어서 주식회사 식물보호기술과 계속적으로 연계하여 기업화할 예정이다.

## 제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

여 백

## 제 1 절 Induced systemic resistance에 대한 기술 정보

전 세계적으로 전신 유도 저항성에 관련된 미생물에 대한 연구가 점차 많아지고 있는 실정이다. 특히 식물생장 촉진 능력이나 병 저항성 유도 능력을 지닌 여러 nonpathogenic 토양 미생물들이 점차적으로 보고되고 있으며, 또한 한 가지 우수 미생물을 이용하는 것 보다는 같은 기능들을 지닌 미생물들 여러 가지를 한꺼번에 쓰는 방법들이 시도되고 있다. 즉 여러 가지 그룹별로 묶은 미생물들을 혼합하여 이용하는 방법이다. 하지만 아직까지 이들 미생물들에 의한 식물의 병 저항성 유도 기작이나 미생물의 결정인자 및 병저항성 유도 인자 등에 대한 연구는 아직 초보여서 본 연구에서 얻어진 연구 결과들은 세계적으로도 밝혀져 있지 않다.

최근에 유럽의 연구팀들이 미생물에 의해 유도되는 식물 유전자를 찾는 연구를 시도하였으나 성공하지 못해 본 연구에서 찾아진 미생물에 의해 유도된 유전자들은 앞으로 유도전신저항성을 산업적으로 이용하는 데도 중요한 자료가 될 것으로 사료된다. 사용하는 미생물에 따라 식물의 병저항성 유도에 대한 기작이 다를 것임이 최근 연구에 의해 암시되어 앞으로 여러 시스템을 이용하여 비교하는 연구들도 진행될 것이다.

## 제 2 절 병 저항성 작물 생산을 위한 기술 정보

지금까지 여러 가지 방법에 의해 식물병 저항성 작물을 생산하려는 노력들이 진행되고 있으나 아직까지 성공적인 작물이나 식물이 개발된 보고는 없다. 병 저항성 작물 생산 방법으로 병원균의 비병원성 유전자를 이용하는 방법, 식물의 병 저항성 유전자를 이용하는 방법, 항균물질 생합성 유전자를 이용하는 방법, 바이러스의 coat protein 유전자를 이용하는 방법들이 수행 중이나 아직까지 병 저항성 작물이 생산된 예는 없다. 이런 방법 이외에 간접적으로 식물병원균에 영향을 주어 식물의 병을 방제하는 방법이 소개되었다. 예를 들어 방제가 어려운 일부 식물 세균 병원균들은 병원성 인자 (독소, 효소)들을 생산할 때 일정 농도이상이어야 하고 신호물질이 생산되어야만 식물에 병을 일으킬 수 있다. 따라서 이러한 병원균의 신호물질을 분해함으로써 식물병원균의 밀도에는 변화를 주지 않고 식물이 병에 걸리지 않게 할 수 있다.

본 연구에서 미생물에 의해 유도되는 식물 유전자와 미생물 유래 병



저항성 관련 유전자들을 담배에 형질 전환하여 내병성을 검정해 보았던 결과 이들이 병 저항성 작물 생산에 이용될 수 있는 가능성을 확인하였다.

### 제 3 절 병저항성 유도 미생물 관련 기술정보

병저항성을 유도하는 미생물에 대한 연구가 점차 확대되어 가고 있고, 이들을 실제 포장에 적용하려는 연구가 전 세계적으로 이루어지고 있다. 전 세계적으로 유용 미생물을 분리하여 제제화하여 상품화하려는 시도가 주류를 이루고 있으나 미생물의 유용형질 인자나 분자생물학적 연구는 이루어지지 않고 있다. 최근 국, 내외에서 식물생장촉진 물질을 분리하고 동정하는 연구가 수행되어 몇 가지 생리활성 물질이 알려지고 있다. *Bacillus*균주가 생산하는 2,3-butanediol과 acetoin이 식물생장 촉진과 병 저항성 유도와 관련되어 있다고 보고되었으며 (Ryu Choong-Min, 2003, 2004) 미생물이 생산하는 plant hormone (IAA, cytokinine, ACC deaminase)들이 식물생장촉진에 관여한다고 알려지고 있다. 병저항성 유도 미생물의 기능이나 유도 물질의 종류가 분리된 미생물에 따라 다름이 밝혀져 있다. 본 연구에 사용된 *P. chlororaphis*는 위에서 기술했던 바와 같이 여러 유용형질을 지닐 뿐만 아니라 본 연구에 의해 여러 가지 돌연변이주와 병 저항성 유도 및 이차대사산물 생산등에 관련된 여러 가지 유전자가 확보되어 추후 병저항성 유도 미생물의 유용형질을 연구하는데 중요한 재료가 될 것이다.

## 제7장 참고문헌

# 여 백

- Alstrom, S., and Burns, R. G. 1989. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biology and Fertility of Soils* 7: 232-238.
- Audenaert K., Pattery T., Cornelis P., and Hofte M. 2002. Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol Plant-Microbe Interact* 15: 1147-56.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 1989. *Current protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons.
- Barrios, H., Valderrama, B., and Morett, E. 1999. Compilation and analysis of 54-dependent promoter sequences. *Nuclei Acid Res.* 27: 4305-4313.
- Benhamou , N., Kloeppe, J.W., Quadt-Hallman, A., and Tuzun, S. 1996. Induction of defense-related ultra structural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiol.* 112: 919-929.
- Bloemberg G.V., O'Toole G.A., Lugtenberg B.J.J., Kolter R. 1997. Green fluorescent protein as a maker for *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4543-51.
- Blumer, C., Heeb, S., Pessi, G., Haas, D. 1999. Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 14073-14078.
- Brisbane, P. G., Janik, L. J., Tate, M. E., and Warren, R. F. O. 1987. Revised structure for the phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (NRRLB-15132). *Antimicro. Agents an Chemo-therapy* 31: 1967-1971.
- Busby, S., and Ebright, R. H. 1997. Transcription activation at class II CAP-dependent promoters. *Mol. Microbiol.* 23: 853-859.
- Chancey, S. T., Wood, D. W., Pierson, E. A., and Pierson, L. S. 2002. Survival of GacS/GacA mutants of the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3308-3314.
- Chancey S. T., Wood, D. W., and Pierson III L. S. 1999. Two-component

- transcriptional regulation of N-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2294-2299.
- Chin-A-Weong T. F. C., Bloemberg, G. V., van der Bij, A. J., and Schripsema, J. 1998. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Mol. Plant-Microbe Interact. 11: 1069-1077.
- Chin-A-Weong T. F. C., van der Bij, A. J., and Lugtenberg, B. J. J. 1997. Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365 using scanning electron microscopy. Mol. Plant-Microbe Interact. 10: 79-86.
- Choi, D., Bostock, R. M., Avdiushko, S., and Hildebrand, D. F. 1994. Lipid-derived signals that discriminate wound- and pathogen-responsive isoprenoid pathways in plants: methyl jasmonate and fungal elicitor arachidonic acid induce different 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes and antimicrobial isoprenoids in *Solanum tuberosum* L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 329-33.
- Clark, T. J., Momany, C., and Neidle, E. L. 2002. The *benPK* operon, proposed to play a role in transport, is part of a regulon for benzoate catabolism in *Acinetobacter* sp. strain ADP1. Microbiol. 148: 1213-1223.
- Conrath, U., Pieterse, C.M., and Mauch-Mani, B. 2002. Priming in plant-pathogen interactions. Trends Plant Sci. 7: 210-216.
- Corbell, N., and Loper, J. E. 1995. A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. J. Bacteriol. 177: 6230-6236.
- Dangl, J. L., Dietrich, R. A., and Richberg, M. H. 1996. Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. Plant Cell 8: 1793-1807.
- Davies, S. J., Golby, P., Omrani, D., Broad, S. A., Harrington, V., Guest, J. R., Kelly, D. J., and Andrews, S. C. 1999. Inactivation and regulation of the aerobic C4-dicarboxylate transport (*dctA*) gene of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 181: 5624-6635.
- Defago, G., Berling, C. H., Burger, U., Hass, D., Kahr, G., Keel, C., Voisard,

- C., Wirthner, P., and Wutrich, B. 1990. Suppression of black root rot of tobacco and other root disease by strains of *Pseudomonas fluorescens*: potential applications and mechanisms. D. Hornby, ed. CAB International, Wallingford, U. K.
- Dekkers L. C., Bloemndaal, C. J. P., de Weger, L. A., Wijffelman, C., Spaik, H. P., and Lugtenberg, B. J. J. 1998. A two component system plays an important role in the root-colonizing ability of *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 45-52.
- Dekkers, L. C., Mulders, I. H. M., Phoelich, C. C., Chin-A-Weong, T. F. C., Lugtenberg, B. J. J. 2000. The *sss* colonization gene of the tomato-*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve root colonization of other wild type *Pseudomonas* bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 1177-83.
- Dekkers, L. C., Phoelich, C. C., van der Fits, L., and Lugtenberg, B. J. J. 1998. A site specific recombinase is required for competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Proc. Natl. Acad. SCI. USA* 95: 7051-7056.
- Dekkers, L. C., van der Bij, A. J., and Mulders, I. H. M. 1998. Role of the O-antigen of lipopolysaccharide, and possible roles of growth rate and NADH:ubiquinone oxidoreductase (*nuo*) in competing tomato root-tip colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 763-771.
- Delaney, T. P., Uknes, S., Vernooji, B., Friederichi, I., Weymann, K., Negrooto, D., Gaffney, T., Gut-Rotta, M., Kasserman, H., Ward, E., and Ryals, J. 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266: 1247-1250.
- Delaney, S. M., Mavroul, D. V., Bonsall, R. F., and Thomashow. L. S. 2000. *phz0*, a Gene for Biosynthesis of 2-Hydroxylated Phenazine Compound in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *J. Bacteriol.* 183: 318-327.
- De Meyer, G., and Hofte, M. 1997. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to

- leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathol.* 87: 588-593.
- Devine, J. H., Countlyman, C., and Baldwin, T. O. 1988. Nucleotide sequence of the *luxR* and *luxI* genes and structure of the *lux* regulon of *Vibrio fischeri* ATCC 7744. *Biochem.* 27: 837-842.
- De Weger, L. A., van der Vlugt, C. I. M., Wijfjes, A. H. M., Bakker, P. A. H. M., Schippers, B., and Lugtenberg, B. J. J. 1987. Flagella of a plant growth stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J. Bacteriol.* 169: 2769-2773.
- de Weger, L. A., Dunber, P., Mahafee, W., Lugtenberg, B. J. J., and Saylor, G. S. 1991. Use of bioluminescence makers for detection of *Pseudomonas* bacteria in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3641-3644.
- de Weger, L. A., van der Vlugt, Wijfjes, A. H. M., Bakker, P. A. H. M., Schippers, B., and Lugtenberg, B. J. J. 1987. Flagella of a plant growth stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J. Bacteriol.* 169: 2769-2773.
- Dunne, C., Delaney, I., Fenton, A., Lohrke, S., Mone-Loccoz, Y., and O'Gara, F. 1996. The biotechnology and application of *Pseudomonas* inoculants for the biocontrol of phytopathogens. *MPMI.* 441-448.
- Elhai, J., and Wolk, C. P. 1988. A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene.* 68: 119-138.
- Eyal, Y., Sagee, O., and Fluh, R. 1992. Dark-induced accumulation of a basic pathogenesis-related (PR-1) transcript and a light requirement for its induction by ethylene. *Plant. Mol. Biol.* 19: 589-99.
- Fry, J., Wood, M., and Poole, P. S. 2001. Investigation of myo-inositol catabolism in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae and its effect on nodulation competitiveness. *Mol. Plant-Micro. Interact.* 14: 1016-1025.
- Fuqua, W. C., and Winans, S. C. 1994. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J. Bacteriol.* 176: 2796-2806.
- Fuqua, W.C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176: 269-275.

- Geels, F. P., and Schippers, B. 1983. Reduction of yield depression in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathol. Z.* 108:207-14.
- Gentry, D. R., Hernandez, V. J., Nguyen, L. H., Jensen, D. B., and Cashel, M. 1993. Synthesis of the stationary-phase sigma factor  $\sigma^S$  is positively regulated by ppGpp. *J. Bacteriol.* 175: 7982- 7989.
- Georgakopoulos, D., Henderson, D. M., Panopoulos, N. J., and Schroth, M. N. 1994. Cloning of a phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 and analysis of its expression *in vitro* with the ice nucleation reporter gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2931-2938.
- Gescher, J., Zaar, A., Mohamed, M., Schagger, H., and Fuchs, G. 2002. Genes encoding for a new pathway of aerobic benzoate metabolism in *Azoarcus evansii*. *J. Bacteriol.* 184: 6301-6315.
- Giblin, L., Boesten, B., Turk, S., Hooykaas, P., and O'Gara, F. 1995. Signal transduction in the *Rhizobium meliloti* dicarboxylic acid transport system. *FEMS Microbiol.* 126: 25-30.
- Gomez-Gomez, L., Bauer, Z., and Boller, T. 2001. Both the extracellular leucine rich repeat domain and the kinase activity of FSL2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 1155-63.
- Gottesman, S. 1996. Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genetics* 30: 465-506.
- Gray, K. M., Passador, L., Iglewski, B.H., and Greenberg, E. P. 1994. Interchangeability and specificity of components from the quorum-sensing regulatory systems of *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 176: 3076-3080.
- Haas, D., and Keel, C. 2003. Regulation of antibiotic production in root colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 117- 153.
- Heeb, S., Blumer, C., and Haas, D., 2002. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Bacteriol.* 184: 1046- 1056.
- Heeb, S., and Haas, D. 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other Gram-negative



- bacteria. *Mol. Plant- Microb. Interact.* 14: 1351-1363.
- Heil, M., and Bostock, R. 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Ann. Bot.* 89: 503-12.
- Heitz, T., Bergey, D. R., and Ryan, C. A. 1997. A gene encoding a chloroplast targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 114: 1085-1093.
- Herbelin, C. J., Chirillo, S. C., Melnick, K. A., and Whittam, T. S. 2000. Gene conservation and loss in the *mutS-rpoS* genomic region of pathogenic *E. coli*. *J. Bacteriol.* 182: 5381- 5390.
- Hoffman, N. E., Ko, K., Milkowski, D., and Pichersky, E. 1991. Isolation and characterization of tomato cDNA and genomic clones encoding the ubiquitin gene *ubi3*. *Plant Mol. Biol.* 17: 1189-1201.
- Homma, Y. 1994. Mechanisms in biological control-focused on the antibiotic pyrrolnitrin. Pages 100-113 in: *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*. M. H. Ryder, P. M. Stephens, and G. D. Bowen, eds. CSIRO Division of Soils, Adelaide, Australia.
- Howell, C. R., and Stipanovic, R. D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* in cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathol.* 69: 480-482.
- Howie, W. J., and Suslow, T. V. 1991. Role of antibiotic synthesis in the inhibition of *Pythium ultimum* in the cotton spermosphere and rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant-Microbe Interact.* 4: 393-399.
- Huang, H., Colella, S., Kurrer, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki H. 2000. Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. *Cancer Res.* 60: 6868-6874.
- Huisman, G. W., and Kolter, R. 1994. Sensing starvation: a homoserine lactone-dependent signaling pathway in *Escherichia coli*. *Science* 265: 537-539.
- Janausch, I. G., Zientz, E., Tran, Q. H., Kroger, A., and Unden, G. 2002. C4-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochemical and Biophysics Acta* 1553: 39-56.

- Jarado, P., Fernandez, L. A., and de Lorenzo, V. 2003. Sigma 54 levels and physiological control of the *Pseudomonas putida* Pu promoter. *J. Bacteriol.* 185: 3379-3383.
- Katsuwon, J., and Anderson, A. J. 1990. Catalase and superoxide dismutase of root-colonizing saprophytic fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3576-3582.
- Kay, K. K., and Kornberg, H. L. 1971. The uptake of C4-dicarboxylic acids by *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 18: 274-281.
- Keel, C., and Defago, G. 1997. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: Mechanisms and ecological impact. 27-46. *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems*. A. C. Gange and V. K. Brown, eds.. Blackwell Scientific, Oxford.
- Kempf, H. J., and Wolf, G. 1989. *Erwinia herbicola* as a biocontrol agent of *Fusarium culmorum* and *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* on wheat. *Phytopathol.* 79: 990-994.
- King, E. O., Ward, M., and Raney, D. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
- Kim Y. C., Miller, C. D., and Anderson A. J. 1997. Identification of adjacent genes encoding the major catalase and a bacterioferritin from the plant-beneficial bacterium *Pseudomonas putida*. *Gene* 199: 219-224.
- Kim, Y. C., Miller, C. D., and Anderson, A. J., 1999. Transcriptional regulation by iron genes encoding iron- and manganese superoxide dismutases from *Pseudomonas putida*. *Gene* 239: 129-135.
- Kim, Y. C., Miller, C. D., Anderson, A. J. 2000. Superoxide dismutase activity in *Pseudomonas putida* affects utilization of sugars and growth on root surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1480-1487.
- Kropp, B. R., Thomas, E., Pounder, J. I., and Anderson, A. J. 1996. Increased emergence of spring wheat after inoculation with *Pseudomonas chlororaphis* isolate 2E3 under field and laboratory conditions. *Biol. Fertil. Soils* 23: 200-206.
- Leeman, M., Van Pelt, J. A., Den Ouden, F. M., Heinsbroek, M., Bakker, P. A. H. M., and Schippers, B. 1995. Induction of systemic resistance against Fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseu-*

- domonas fluorescens*. Phytopathol. 85: 1021-1027.
- Leon, J., Shulaev, V., Yalpani, N., Lawton, M. A., and Raskin, I. 1995. Benzoic acid 2-hydroxylase, a soluble oxygenase from tobacco, catalyzes salicylic acid biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 10413-10417.
- Leong, S., Ditta, G., and Helinski, D. 1982. Heme biosynthesis in *Rhizobium*. J. Biol. Chem. 257: 8724-8730.
- Lugtenberg, B. J., and Dekkers, L. C. 1999. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? Environ. Microbiol. 1: 9-13.
- Lugtenberg, B. J. J., Dekkers, L., and Bloemberg, G. V. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by pseudomonas. Annu. Rev. Phytopathol. 39: 461-490.
- Lugtenberg, B. J. J., de Weger, L. A., and Bennett, J. W. 1991. Microbial stimulation of plant growth and protection from disease. Curr. Opin. Biotechnol. 2: 457-464.
- Lugtenberg, B. J., Kravchenko, L. V., and Simons, M. 1999. Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. Environ. Microbiol. 1: 439-446.
- Loewen, P. C., Hu, B., Strutinsky, J., and Sparling, R. 1998. Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. Can. J. Microbiol. 44: 707- 717.
- Lovic, B., Heck, C., Gallian, J. J., and Anderson, A. J. 1999. Inhibition of the sugarbeet pathogens *Phoma betae* and *Rhizoctonia solani* by bacteria associated with sugarbeet seeds and roots. J. Sugar Beet Res. 30: 169-184.
- MacAdam, J. W., Sharp, R. E., Nelson, C. J. 1992. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue: II. Spatial distribution of apoplastic peroxidase activity in genotypes differing in length of the elongation zone. Plant Physiol. 99: 879-885.
- Martinez-Garcia, E., Tormo, A., and Navarro-Llorens, J. M. 2003. Polymorphism in the *yclC-rpoS* region of enterobacteria. Curr. Microbiol. 46: 365- 370.
- Mathieu, O., Yukawa, Y., Prieto, J-L., Vaillant, I., and Sugiura, M. 2003. Identification and characterization of transcription factor IIIA and

- ribosomal protein L5 from *Arabidopsis thaliana*. Nucleic Acids Res. 31: 2424-2433.
- Maurhofer, M., Keel, C., Schinider, U., Voisard, C., Haas, D., and Defago, G. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. Phytopathol. 82: 190-195.
- Mavrodi, M. V., Ksenzenko, V. N., Bonsall, R. F., Cook, R. J., Boronin, A. M., and Thomashow, L. S. 1998. A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. J. Bacteriol. 180: 2541-2548.
- Mazzola, M., Cook, R. J., Thomashow, L. S., Weller, D. M., and Pierson III, L. S. 1992. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2616-2624.
- McClellan, K. H., Wilson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabara, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., Bycroft, B. W., Stewart, G. S. A. B., and Williams, P. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. Microbiol. 143: 3703-3711.
- Meharg, A. A., and Killham, K. 1995. Loss of exudates from the roots of perennial ryegrass inoculated with a range of microorganisms. Plant Soil 170: 345-349.
- Miller, C. D., Kim, Y. C., and Anderson, A. J. 1997. A method to derive a promoter fusion and activate the gene for the stationary-phase inducible catalase (*catC*) from *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 179: 5241-5245.
- Miller, C. D., Kim, Y. C., and Anderson, A. J. 2001. Competitiveness in root colonization by *Pseudomonas putida* requires the *rpoS* gene. Can. J. Microbiol. 47: 41-48.
- Mukhopadhyay, S., Audia, J. P., Roy, R. N., Schelhorn, H. E. 2000. Transcriptional induction of the conserved alternative sigma factor RpoS in *Escherichia coli* is dependent on BarA, a probable two-component regulator. Mol. Microbiol. 37: 371-381.

- Murphy, A. M., Holcombe, L. J., and Carr, J. P. 2000. Characteristics of salicylic acid-induced delay in disease caused by a necrotrophic fungal pathogen in tobacco. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57: 47-54.
- Nadimpalli, R., Yalpani, N., Johal, G. S., and Simmons, C. R. 2000. Prohibitins, stomatins, and plant disease response genes compose a protein superfamily that controls cell proliferation, ion channel regulation, and death. *J. Biol. Chem.* 275: 29579-29586.
- Norman-Setterblad, C., Vidal, C., and Palva, E. T. 2000. Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol Plant-Microbe Interact.* 13: 430-438.
- O' Sullivan, D. J., and O' Gara, F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* 56: 662-676.
- Ownley, B. H., Weller, D. M., and Thomashow, L. S. 1992. Influence of *in situ* and *in vitro* pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Phytopathol.* 82: 178-184.
- Park, K. S., and Kloepper, J. W. 2000. Activation of PR-1a promoter by rhizobacteria that induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Biol. Control* 18: 2-9.
- Paulitz, T. C. 1990. Biochemical and ecological aspects of competition in biological control. 713-724. *New Direction in Biological Control, Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*. R. Baker and P. E. Dunn, eds. Liss, Chicago.
- Pernestig, A. K., Melefors, O., and Georgellis, D. 2001. Identification of uvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276: 225-231.
- Pierson, L. S., III, and Thomashow, L. S. 1992. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Mol. Plant Microb. Interact.* 5: 330-339.
- Pierson, L. S., III, Gaffney, t., Lam, S., and Gong, F. 1995. Molecular analysis of genes encoding phenazine biosynthesis in the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *FEMS Microbiol.*

- Lett. 134: 299-307.
- Pierson, L. S., III, Keppenne, V. D., and Wood, D. W. 1994. Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. J. Bacteriol. 176: 3966-3974.
- Pierson III, L. S., and Pierson, E. 1996. Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. FEMS Microbiol. Lett. 136: 101-108.
- Pierson III, L. S., Wood, D. W., and Pierson, E. 1998. Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 36: 207-225.
- Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., Hoffland, E., Vanpelt, J. A., and van Loon, L. C. 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis related gene expression. Plant Cell 8: 1225-1237.
- Pieterse, C. M., van Wees, S. C., van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J., and van Loon, L. C. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell 10: 1571-1580.
- Phillips, D. A., and Streit, W. 1995. Signals to rhizobial symbionts: a new approach for defining rhizosphere colonization. In plant-Microbe Interactions, ed. G. Stacey, N. T. Keen, pp. 236-71. New York: Chapman & Hall
- Radtke, C., Cook, W. S., and Anderson, A. J. 1994. Factors affecting antagonism of the growth of *Phanerochaete chrysosporium* by bacteria isolated from soils. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41: 274-280.
- Raupach, G. S. and Kloepper, J. W. 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. Phytopathol. 88: 1158-1164.
- Reddi, T. K. K., Khudyakov, Y. P., and Borovkov, A. V. 1969. *Pseudomonas fluorescens* strain 26-o, a producer of phytotoxic substances. Microbiol. 38: 909-913.
- Riethdorf, S., Volker, U., Gerth, U., Winkler, A., Engelmann, S. and Hecker, M. 1994. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus*

- subtilis lon* gene. J. Bacteriol. 176: 6518-6527.
- Rovira, A. D., and Campbell, R. 1975. A scanning electron microscope study of interactions between microorganism and *Gaeumannomyces graminis*(Syn. *Ophiobolus graminis*) on wheat roots. Microbe. Ecol. 3: 177-185
- Rutherford, S., and Moore, I. 2002. The *Arabidopsis* Rab GTPase family: another enigma variation. Cur. Opi. Plant Biol. 5: 518-528.
- Sarnigue, A., Kraus, J., Henkels, M. D., Muehlchen, A. M., and Loper, J. E. 1995. The sigma factor RpoS affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 12255-12259.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Scher, F. M., Klopper, J. W., Scingleton, C., Zaleska, I., and Laliberte, M. 1988. Colonization of soybean roots by pseudomonas and serratia species: relationship to bacterial motility, chemotaxis and generation time. Phytopathol. 78: 1055-59.
- Schippers, B., Bakker, A. W., Bakker, P. A., and Van Peer, H. M. 1990. Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. Plant Soil 129: 75-83.
- Schmidt-Eisenlohr, H., Gast, A., and Baron, C. 2003. Inactivation of *gacS* does not affect the competitiveness of *Pseudomonas chlororaphis* in the *Arabidopsis thaliana* rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol. 69: 1817-1826.
- Schwyn, B., and Neilands, J. B. 1987. Universal CAS assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. 160: 47-56.
- Shaw, P. D., Ping, G., Daly, S. L., Cha, C., Cronan, J. E. jr., Rinehart, K. L., and Farrand, S. K. 1997. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecule by thin-layer chromatography. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 6036-6041.
- Shiba, T., Tsutsumi, K., Yano, H., Ihara, Y., Kameda, A., and Tanaka, K. 1997. Inorganic polyphosphate and the induction of *rpoS* expression.

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 11210-11215.
- Slininger, P. J., Van Cauwenberge, J. E., Bothast, R. J., Weller, D. W., Thomashow, L. S., and Cook, R. J. 1996. Effects of growth culture physiological state, metabolites, and formulation on the viability, phytotoxicity, and efficacy of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79 stored encapsulated on wheat seeds. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 391-398.
- Slininger, P. J., and Jackson, M. A. 1992. Nutritional factors regulating growth and accumulation of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 388-392.
- Staskawicz, B., Dahlbeck, D., Keen, N., and Napoli, C. 1987. Molecular characterization of cloned avirulence genes from race0 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J. Bacteriol.* 169: 5789-5794.
- Stevens, A. M., Dolan, K. M., and Gretnberg, E. P. 1994. Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the *lux* promoter region. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91: 12619-12623.
- Streit, W. R., Joseph, C. M., Phillips, D. A. 1996. Biotin and other water-soluble vitamins are key growth factors for alfalfa root colonization by *Rhizobium meliloti* 1021. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 330-38.
- Suh, S. J., Silo-Suh, L., Woods, D. E., Hassett, D. J., West, S. H. E., and Ohman, D. E. 1999. Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181: 3890- 3897.
- Thomas, E. 1988. Phytotoxicity of *Pseudomonas chlororaphis* O6: role of phenazines and implications for biocontrol. MS thesis, Utah State University.
- Thomas, F. C., Chin, A. W., Bleomberg, G. V., Mulders, I., Dekkers, L. C., and Lugtenberg, B. J. J. 2000. Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular Plant-Microbe Interact.* 13: 1340-1345.
- Thomashow, L. S., and Weller, D. M. 1995. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: Mechanisms and



- antifungal metabolites. Pages 187-235 in: Plant-Microbe Interactions. G. Stacey and N. T. Keen, eds. Chapman & Hall, New York.
- Thomashow, L. S., and Weller, D. M. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. J. Bacteriol. 170: 3349-3508.
- Thomma B. P. H. J., Eggermont, K., Tierens, K. F. M. J., and Broekaert, W. F. 1999. Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. Plant Physiol. 121: 1093-1101.
- Timms-Wilson, T. M., Ellis, R. J., Renwick, A., Rhodes, D. J., Mavrodi, D. V., Weller, D. M., Thomashow, L. S., and Bailey, M. J. 2000. Chromosomal insertion of phenazine-1-carboxylic acid biosynthetic pathway enhances efficacy of damping-off disease control by *Pseudomonas fluorescens*. Molecular Plant-Microbe Interact. 13: 1293-1300.
- Toohy, J. I., Nelson, C. D., and Krotov, G. 1965. Toxicity of phenazine carboxylic acids to some bacteria, algae, higher plants, and animals. Can. J. Bot. 43: 1151-1155.
- Tucker, B., Radtke, C., Kwon, S. I., and Anderson, A. J. 1995. Suppression of bioremediation by *Phanerochaete chrysosporium* by soil factors. J. Haz. Mater. 41: 251-265.
- Turner, J. M., and Messenger, A. J. 1986. Occurrence, biochemistry, and physiology of phenazine pigment production. Adv. Micro. Physiol. 27: 211-275.
- Van Peer R., Schippers B. 1992. Lipopolysaccharides of plant growth promoting *Pseudomonas* sp. strain WCS417r induce resistance in carnation to *Fusarium* wilt. Netherlands J. Plant Pathol. 98: 129-39.
- Van Peer, R., Niemann, G. J., and Schippers, B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS 417r. Phytopathol. 81: 728-734.
- Vera-Estrella, R., Higgins, V. J., and Blumwald, E. 1994. Plant defense response to fungal pathogens (II). G-protein-mediated changes in host plasma membrane redox reactions). Plant Physiol. 106: 97-102.

- Vilchez, S., Molina, L., Ramos, C., and Ramons, J. L. 2000. Proline catabolism by *Pseudomonas putida*: cloning, characterization, and expression of the *put* genes in the presence of root exudates. *J. Bacteriol.* 182: 91-99.
- Weller, D. M. 1983. Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. *Phytopathol.* 73: 1548-1553.
- Weller, D. M., and Cook, R. J. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathol.* 73: 463-469.
- Whistler, C. A., Stockwell, V. O., and Loper, J. E. 2000. Lon protease influences antibiotic production and UV tolerance of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2718-2725.
- Whistler, C. A., Corbell, N. A., Sarniguet, A., Ream, W., and Loper, J. E. 1998. The two-component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor  $\sigma_{rs}$  and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* 180: 6635-6641.
- Whiteley, M., Lee, K. M., and Greenberg, E. P. 1999. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13904-13909.
- Wolk, C. P., Cai, Y., and Panoff, J. M. 1991. Use of a transposon with luciferase as a reporter to identify environmentally responsive genes in a cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5535-5539.
- Wong, J. M., Mafune, K., Yow, H., Rivers, E. N., Ravikumar, T. S., Steele, G. D. Jr., and Chen, L. B. 1993. Ubiquitin-ribosomal protein S27a gene overexpressed in human colorectal carcinoma is an early growth response gene. *Cancer Res.* 53: 1916-1920.
- Wood, D. W., Gong, F., Daykin, M. M., Williams, P., and Pierson III, L. S. 1997. N-acyl homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the rhizosphere of wheat. *J. Bacteriol.* 179: 7663-7670.
- Wood, D. W., and Pierson III, L. S. 1994. Cell to cell interactions among rhizosphere bacteria influence the expression of phenazine antibiotics in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Phytopathol.* 84: 1134.

- Wood, D. W., and L. S. Pierson III. 1996. The *phzI* gene of *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is responsible for the production of a diffusible signal required for phenazine antibiotic production. *Gene* 168: 49-53.
- Yang, K-Y., Liu, Y., and Zhang, S. 2001. Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 741-746.
- Yang, K-Y., Blee, K. A., Zhang, S., and Anderson, A. J. 2002. Oxycom treatment suppresses *Pseudomonas syringae* infection and activates a mitogen activated protein kinase pathway in tobacco. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 61: 249-256.
- Yoshida, K. I., Aoyama, D., Ishio, I., Shibayama, T., and Fujita, Y. 1997. Organization and transcription of the myo-inositol operon, *iol*, of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 179: 4591-4598.
- Yoshikawa, M., Hirai, N., Wakabayashi, K., Sugizaki, H., and Iwamura, H. 1993. Succinic and lactic acids as plant growth promoting compounds produced by rhizosphere *Psuedomonas putida*. *Can. J. Microbiol.* 39: 1150-1154.
- Yurgel, S., Mortimer, M., Rogers, K. N., Kahn, M. L. 2000. New substrates for the dicarboxylate transport system of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 182: 4216-4221.
- Zhu, J. K., Liu, J., and Xiong, L. 1998. Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*. Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* 10: 1181-1191.
- Zdor, R., and Anderson A. J. 1992. Influence of root colonizing pseudomonads on defense mechanisms of bean. *Plant Soil* 140:99-107.