

## Glyphosate 저항성 *Pseudomonas* sp. Strain HG-1의 분리 및 저항성 유전자의 클로닝

이병철<sup>1</sup> · 조홍범 · 채영규<sup>2</sup> · 최영길\*

한양대학교 생물학과 <sup>1</sup>유전공학과 <sup>2</sup>생화학과

본 연구는 제조체의 일종인 glyphosate에 저항성을 갖는 균주를 분리하고 그 유전자를 cloning함으로써 glyphosate에 저항성을 갖는 유용작물의 인위적 생성 가능성을 모색하고자 하였다. 제조체가 처리된 토양환경으로부터 glyphosate에 고도의 저항성을 나타내는 균주를 분리하였다. 분리된 균주를 동정한 결과 *Pseudomonas cepacia*로 밝혀졌으며 10 mM의 glyphosate가 처리된 환경에서도 강한 내성을 갖는 것으로 나타났다. Glyphosate 저항성 유전자는 염색체상에 존재하는 것으로 판명되었으며 저항성 유전자를 클로닝한 결과 glyphosate에 저항성을 나타내는 클론(*E. coli* THG-101)을 얻었으며 *P. cepacia*에서 유래된 glyphosate 저항성 유전자를 갖고 있는 plasmid pGR19를 확인하였다.

**KEY WORDS** □ *Pseudomonas cepacia*, *Escherichia coli* C600, Glyphosate, Resistant gene-cloning

일반적으로 사용되고 있는 대부분의 제조체들의 일차작용은 크게 두가지로 나뉘어진다. 식물체내의 단백질 혹은 아미노산 생합성 과정에 필요한 중요한 효소 화학적인 반응에 제조체가 기질과 유사한 억제제로 작용하여 필수 아미노산의 합성을 방해하거나 엽록체의 제 2광계(Photosystem II)에 있는 D1 단백질에 결합하여 광합성의 전자전달회로에서 전자의 흐름을 억제함으로써 광합성을 저해하는 것으로 보고되어 있다(10, 12, 15).

본 연구에서는 여러종류의 제조체 중, 방향족 아미노산인 tyrosine, phenylalanine, tryptophan의 생합성 과정을 저해하는 제조체인 glyphosate (N-phosphonomethylglycine)에 대한 연구를 수행하였다. Glyphosate는 Monsanto 회사의 Roundup이라고 하는 제조체의 주성분으로 모든 식물체에 비선택적으로 작용하며 고단위 활성을 나타내는 동시에 토양 잔류 활성이 거의 없다는 이유로 제조체로써 널리 이용되어지고 있다(12, 13). Glyphosate의 일차적인 작용은 방향족 아미노산의 생합성 경로인 shikimic pathway에 관여하는 효소인 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase(EPSPS)에 대해 강력한 저해제로 작용함으로써 방향족 아미노산의 생합성을 차단시키는 것으로 알려졌으며(9, 21), glyphosate가 EPSPS의 활성을 저해한다는 사실은

EPSPS의 기질로써 작용하는 shikimate의 농도가 glyphosate를 처리해 주면 증가되어진다는 사실로부터 밝혀졌다(12)

지금까지 glyphosate에 관한 연구는 *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752 (16), *Arthrobacter* sp. GLP-1(17, 18), *Pseudomonas*(8, 13), *Flavobacterium* (2) 및 *Rhizobium*(11) 등이 glyphosate를 분해하는 것으로 보고되었으며, *Salmonella typhimurium*(4, 5), *E. coli*(19) 및 *Petunia hybrida* 세포주(22) 등은 glyphosate에 저항성을 갖도록 유전자를 변형시키는 것으로 보고되었다. 또한, *Nicotiana tabacum*(3)이나 당근 세포주(14) 등도 glyphosate를 연속적으로 처리하면서 세포배양을 하면 상당한 수준의 저항성을 획득하게 되는 것으로 보고되었다. 이렇게 glyphosate에 저항성을 갖도록 유전자를 변형시키는 분자적 기작은 크게 두 가지로 알려져 있는데, EPSPS를 만들어내는 *aroA* 유전자내에 돌연변이를 유발시켜 enzyme activity는 동일하지만 glyphosate에 대한 감수성을 약화시킴으로써 저항성을 획득하게 하거나, 또는 *aroA* 유전자를 증폭시켜서 EPSPS를 과량 생성해냄으로써 저항성을 획득하는 것이다(4, 5).

본 연구에서는 glyphosate에 저항성을 갖는 세균을 토양으로부터 직접 분리하여, 이들로부터 저항성 유전자를 클로닝함으로써 glyphosate에 내성을 갖는 개체의 특성을 연구하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### Glyphosate 저항성 균주의 분리 및 동정

\*To whom correspondence should be addressed.  
이 연구는 1990년도 교육부 학술연구 조성비(유전공학)의 일부에 의하여 연구되었음.

Glyphosate에 대한 내성 혹은 분해능을 가진 미생물의 분리를 위해 제조제가 처리된 과수원이나 농경지로 부터 채취한 토양 1g을 초기농도 0.1 mM로 glyphosate가 첨가된 Dworkin-Foster salt mixture(6)의 변형된 배지(DF 배지:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2.0 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg;  $\text{NaCl}$ , 15 mg;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10  $\mu\text{g}$ ;  $\text{MnSO}_4$ , 10  $\mu\text{g}$ ;  $\text{ZnSO}_4$ , 70  $\mu\text{g}$ ;  $\text{CuSO}_4$ , 50  $\mu\text{g}$ ;  $\text{MoO}_3$ , 10  $\mu\text{g}$ ; potassium acetate, 4.0 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.0 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6.0 g; glucose, 7.0 g; add distilled water to make 1l)에 배지에 접종하여 1주일 혹은 수주일 간격으로 농화 배양하면서 계대배양할 때 마다 glyphosate의 농도를 점차적으로 높혀주었다.

선별된 세균에 대한 동정은 그람 염색과 광학현미경을 통한 형태적 특성 및 API Kit(API bio Merieux) 20E, 20NE에 의한 생화학적 특성에 따라 동정하였다.

#### 클로닝에 사용된 균주, 배지 및 시약

Glyphosate 저항성 유전자의 클로닝을 위하여 숙주는 *Escherichia coli* C600, vector는 pUC19을 이용하였고 이들의 증폭을 위해서는 Sambrook 등(1989)의 방법에 의해 LB 배지, M9 배지 등에 ampicillin을 필요에 따라 첨가 사용하였다. Transformation된 저항성 유전자를 찾기 위하여 사용한 배지는 Thi(4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Leu(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Thr(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Amp(60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 및 3 mM의 glyphosate를 함유하는 DF 액체 최소배지와 5 mM glucose, 3 mM glyphosate, 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ampicillin 및 0.1 mM/ml의 IPTG를 첨가한 M9 salts 배지를 사용하였다. 순도 99%의 glyphosate 원제는 (주) 미성화학으로부터 분양받았고, 제한효소, ligase 등 DNA 조작에 관련된 효소들과 시약은 Boehringer Mannheim (Munich)에서 구입하였으며, 배지 조제에 필요한 시약은 모두 Difco 및 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)에서 구입, 사용하였다.

#### DNA의 분리 및 agarose 전기영동

*Pseudomonas cepacia*에서의 chromosomal DNA 분리는 CTAB/NaCl을 이용하는 EtBr-CsCl sedimentation의 방법(1)을 따랐으며, plasmid DNA의 분리는 alkaline lysis를 이용하였고 필요에 따라 EtBr-CsCl 침전법을 병용하였다(20). 전기영동은 1% agarose gel에서 90 mM Tris, 90 mM boric acid, 1 mM EDTA (pH 8.0; TBE) 완충용액으로 전개시킨 후, DNA bands는 ethidium bromide로 염색후 관찰하였다.

#### *Pseudomonas cepacia*의 DNA library 제조

클로닝하기 위하여 사용된 DNA는 *Pseudomonas cepacia*에서 얻은 chromosomal DNA를 Sau3A1으로 부분적으로 소화하여 agarose gel electrophoresis를 하고 약 1~kb에 이르는 DNA 절편만을 electroelution한 후 polyethylenglycol로 침전시켜 정제하였다. 사용한 vector는 pUC19으로, 이를 BamHI

으로 절단한 후 alkaline phosphatase를 처리하여 dephosphorylation시킴으로써 self-ligation을 방지하였다. 위에서 얻은 insert와 vector의 비율이 3:1 혹은 10:1이 되게끔 처리한 후 16C에서 T4 DNA ligase를 반응시켜 recombinant pool을 제조하고  $\text{CaCl}_2$ 로 처리된 숙주인 competent *E. coli* C600에 transformation하여 *Pseudomonas cepacia*의 DNA library를 제조하였다(20).

#### Glyphosate 저항성 유전자의 탐색 및 유도

Transformants 중에서 glyphosate 저항성 유전자를 가진 것 들만 선별적으로 유도하기 위하여 Fitzgibbon과 Braymer의 방법(7)에 따라 수행하였다. 즉, transformation후 LB 액체배지에서 45분간 선 배양한 다음 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Amp과 20 mM의  $\text{MgSO}_4$ 를 함유하는 5 ml의 LB 액체배지가 들어있는 cap tube에 300  $\mu\text{l}$ 의 transformed cell용액을 접종하고 혼탁도가 나타날 때까지 37C에서 배양시켰다. 혼탁도가 나타난 cap tube만을 대상으로 균체를 수확하여 생리식염수로 두번 씻은 다음, 균액의 일성량을 Thiamine(4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Leucine(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Threonine(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Ampicillin (60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 및 3 mM의 glyphosate를 함유하는 DF 최소배지 혹은 5 mM glucose, 5 mM glyphosate가 들어있는 M9 배지에 접종하고 0.1 mM/ml IPTG로 induction시켜 glyphosate에 저항성이 있거나 이를 분해하는 transformant를 동일 고체배지에 도말하여 선별하였다.

#### 결과 및 고찰

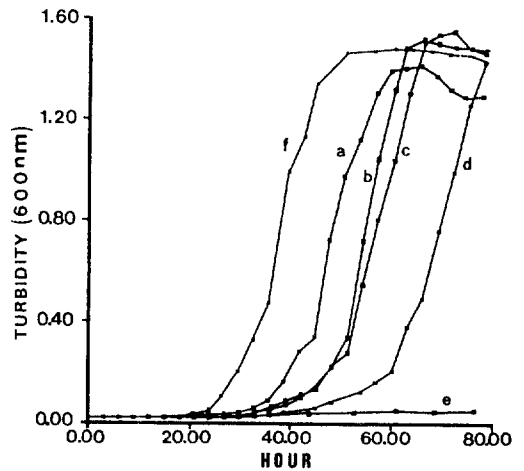
##### Glyphosate 저항성 균주의 분리 및 동정

Glyphosate를 분해하는 것으로 알려진 균들 중 *Arthrobacter* sp. GLP-1은 5 mM의 glyphosate가 존재하는 상태에서도 성장하며(17, 18), *Pseudomonas* sp. strain PG2982의 경우는 4일 이내에 1 mM농도의 glyphosate를 완전히 분해하는 것으로 보고되었고(13), glyphosate가 잔존하는 폐수내에서 분리한 *Pseudomonas* sp. strain LBr은 20 mM농도의 glyphosate도 제거할 수 있는 것으로 보고되었다(8). 또한 당근 세포주의 경우에서 것듯이 glyphosate에 지속적으로 노출되어 적응력을 획득한 세포들은 6.3 mM의 농도에서도 성장함으로써 그렇지 않은 세포들이 지니는 0.12 mM 농도에서의 저항능력보다 52 배나 증가된 저항성을 획득한 것으로 보고되었다(14).

본 실험의 경우 토양 미생물들 중 저항성이 우수한 균주를 획득하기 위하여 0.5 mM의 무기인산을 함유한 Dworkin-Foster salt mixture(DF)의 변형된 배지에 0.1 mM에서 부터 시작하여 5 mM의 수준으로 glyphosate의 농도를 서서히 높혀주면서 수주일간 mixed culture를 수행한 후 5 mM의 glyphosate와 0.5 mM의 무기인산을 함유하는 DF 고체배지에 희석, 도말하고 30C에서 배양한 결과 비교적 빠른 속도로

**Table 1.** Morphological and biochemical characteristics of isolate, *Pseudomonas* sp. strain HG-1

Test Items	Characteristics
Cell arrangement	single
Shape	rod
Colony form	circular
Cell pigment	clear
Motility	+
Gram stain	-
Nitrite formation	+
Nitrogen formation	+
Indole production	-
Glucose acidification	-
Arginine dihydrolase	-
Ureas test	-
Esculin hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	-
$\beta$ -galactosidase	+
Carbohydrate utilization	
Glucose	+
Arabinose	+
Mannose	+
Mannitol	+
N-acetyl-glucosamine	+
Maltose	-
Gluconate	+
Caprate	+
Adipate	+
Malate	+
Citrate	+
Phenyl-acetate	+
Cytochrome oxidase	+

**Fig. 1.** The growth curve of *P. cepacia*.

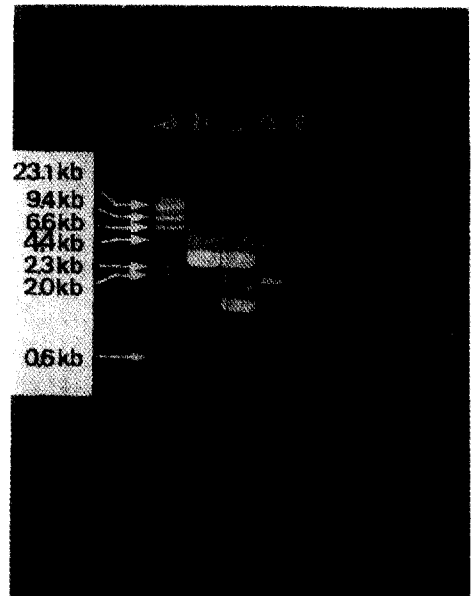
a. 2 mM glyphosate + 0.5 mM inorganic phosphate, b. 5 mM glyphosate + 0.5 mM inorganic phosphate, c. 7 mM glyphosate + 0.5 mM inorganic phosphate, d. 10 mM glyphosate + 0.5 mM inorganic phosphate, e. 5 mM glyphosate only, f. 0.5 mM inorganic phosphate only.

성장하는 균체들을 관찰할 수 있었으며 이들 균체들 중 colony가 상대적으로 큰 균주를 선택하여 HG-1 이라고 명명하였다.

분리균주 HG-1은 그람 염색과 광학현미경하의 형태적 특성 및 API kit 20 NE에 의한 생화학적 특성에 따라 동정한 결과 *Pseudomonas cepacia*로 밝혀졌으며 그 결과는 Table 1에 나타내었다.

#### 분리균주의 성장곡선

분리균주 *Pseudomonas cepacia*의 glyphosate 농도에 따른 성장곡선상의 변화를 추적하였다. Fig. 1을 보면 인산원으로 무기인산만을 첨가한 경우 약 20시간의 잠복기를 나타낸 반면 glyphosate의 농도가 증가함에 따라 최고 약 60시간 까지 잠복기가 길어지는 성장 양상을 나타내고는 있으나 미생물이 이용하기 쉬운 무기인산만을 공급한 대조군과 거의 대등한 수준의 성장규모를 나타내었다. 반면 무기인산이 첨가되지 않고 glyphosate 만이 유일한 인산원으로 공급된 배지에서는 균이 전혀 성장하지 않는 것으로 보아 분리된 *P. cepacia*는 glyphosate를 인산원으로 이용하지는 못함을 알 수 있다. 따라서 분리균주 *P. cepacia*는 glyphosate를 인산원으로는 이용할 수는

**Fig. 2.** Identification of the inserted gene.

a. Hind size marker, b. Digested pUC19 by BamH, c. Digested pGR19 by BamH, d. Uncutted pUC19, e. Uncutted pGR19.

없으나 이 제초제에 대한 고도의 저항성을 획득한 것으로 판단되었다. 한편 glyphosate에 저항성을 부여하는 유전자가 염색체상에 있는지 또는 plasmid

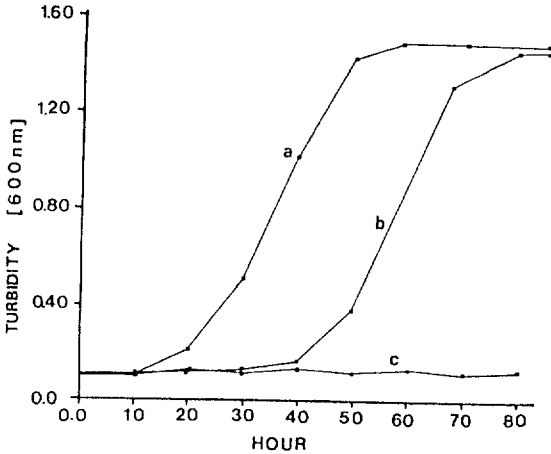


Fig. 3. The growth patterns of (a) *E. coli* THG-101, (b) *P. cepacia* and (c) *E. coli* C600 on Dworkin-Foster salt mixture containing 0.5 mM inorganic phosphate and 5 mM glyphosate.

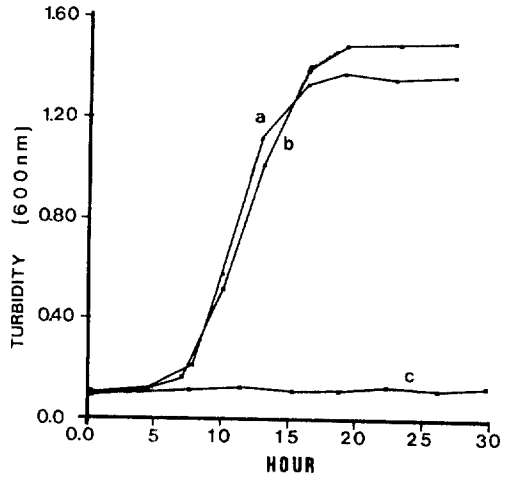


Fig. 4. The growth patterns of *E. coli* THG-101 on different media.

a. 0.5 mM inorganic phosphate only, b. 5 mM glyphosate + 0.5 mM inorganic phosphate, c. 5 mM glyphosate only.

상에 있는지의 여부를 알아보기 위하여 5 mM glyphosate가 함유되어 있는 DF 최소배지에 균을 접종하고 약 50시간 정도 배양시킨 후에 plasmid 분리시험 및 curing test를 병행한 결과 PPT 분해능은 chromosomal DNA에 기인함을 알 수 있었다(data not shown).

**Glyphosate 저항성 유전자의 클로닝**

Glyphosate에 저항성을 갖는 *P. cepacia*로부터 저항성 유전자를 클로닝하기 위하여, 분리한 chromosomal DNA를 *Sau3A1*으로 부분 소화하여 얻은 1-8 kb의 DNA 절편을 *BamHI*이 처리된 pUC19에 넣었고 얻어진 recombinant pool을 *E. coli* C600에 transformation 하여 *P. cepacia*의 genomic DNA library를 제조하였다. Fitzgibbon과 Braymer의 방법 (6)에 따라 저항성 유전자를 스크리닝, 증폭시킨 후 5 mM의 glyphosate와 Thiamine, Threonine, Leucine 및 Ampicillin이 함유된 DF 고체배지에 균을 도말함으로써 저항성을 획득한 클론을 얻었으며 그 중에서 한개의 colony를 취하여 형질전환되지 않은 *E. coli* C600과 함께 동일조건으로 고체배지에 접종함으로써 형질전환된 사실을 비교, 확인한 후 이 클론을 *E. coli* THG-101이라고 하였다. THG-101으로부터 plasmid를 분리한 후 *BamHI* 으로 digestion하고 전기영동을 수행한 결과(Fig. 2), 2.7 kb의 pUC19에서 유래된 제한효소 절편과 약 1 kb의 *P. cepacia*에서 유래된 insert DNA가 재조합된 plasmid(pGR19라고 명명)를 확인하였다.

클로닝된 저항성 유전자의 *E. coli* C600에서 발현 결과를 glyphosate 첨가 배지에서의 성장 정도로 나타낸 결과는 Fig. 3 및 Fig. 4에서 보여주고 있다. 그림에서 보는 바와 같이 pGR19가 없는 *E. coli* C600은 0.5 mM의 무기인산과 5 mM의 glyphosate가 첨

가된 DF 배지에서 전혀 성장하지 못하는 반면 *E. coli* THG-101은 오히려 *P. cepacia*의 야생형 보다 잠복기가 훨씬 짧고 왕성한 성장양상을 나타내고 있다 (Fig. 3). 또한 앞서 분리군주 *P. cepacia*의 glyphosate의 농도에 따른 성장곡선상(Fig. 3)의 특징은 glyphosate의 농도가 증가할 수록 그 잠복기는 길어지는 양상을 나타낸 반면, THG-101의 경우 무기인산 만이 공급된 배지에서도나 glyphosate가 첨가된 배지에서도 그 잠복기의 차이가 전혀 없을 뿐만 아니라 오히려 더 왕성한 성장을 나타내고 있다(Fig. 4). 이러한 결과는 *P. cepacia*에서 클로닝된 glyphosate에 대한 저항성 유전자가 증폭되어 비교적 고농도의 glyphosate가 존재하는 환경에서도 빠른 성장을 보이는 것으로 판단되며, 본 실험에서 클로닝된 glyphosate 저항성 유전자가 효과적으로 발현되었음을 시사하고 있다. 본 실험에서 클로닝된 glyphosate에 대한 저항성의 연구는 glyphosate에 의한 저항성의 증가가 아닌 만큼 가치가 있는 것이며 자세한 유전자의 특성이 빠른 시간내에 규명되어야 할 것으로 본다.

**참 고 문 헌**

1. Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl, 1987. Current protocols in molecular biology, 1st ed. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, section 2.4.
2. Balthazor, T.M. and L.E. Hallas, 1986. Glyphosate-degrading microorganisms from

- industrial activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 432-434.
3. **Choi, S.B. and K. W. Lee**, 1987. Regeneration of glyphosate-resistant plant from tobacco (*Nicotiana tabacum*) cell culture. *Korean J. Bot.*, **30**, 69-77.
  4. **Comai, L., L.C. Sen and D.M. Stalker**, 1983. An altered *aroA* gene product confers resistance to the herbicide glyphosate. *Science*, **221**, 370-371.
  5. **Comai, L., D. Facciotti, W.R. Hiatt, G. Thompson, E.E. Rose and D.M. Stalker**, 1985. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature*, **317**, 741-744.
  6. **Dworkin, M., and J.W. Foster**, 1958. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *J. Bacteriol.*, **75**, 592-603.
  7. **Fitzgibbon, J.E. and H.D. Braymer**, 1990. Cloning of a gene from *Pseudomonas* sp. strain PG2982 conferring increased glyphosate resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3382-3388.
  8. **Jacob, G.S., J.R. Garbow, L.E. Hallas, N.M. Kimack, G.M. Kishore and J. Schaefer**, 1988. Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain LBr. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2953-2958.
  9. **Jaworski, E.G.**, 1972. Mode of action of N-phosphonomethyl-glycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.*, **20**, 1195-1198.
  10. **Kishore, G.M. and D. Shah**, 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 627-663.
  11. **Liu, C.M., P.A. Mclean, C.C. Sookdeo and F.C. Cannon**, 1991. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1799-1804.
  12. **Mazur, B.J. and S.C. Falco**, 1989. The development of herbicide resistant crops. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **40**, 441-470.
  13. **Moore, J.K., H.D. Braymer and A.D. Larson**, 1983. Isolation of a *Pseudomonas* sp. which utilizes the phosphonate herbicide glyphosate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 316-320.
  14. **Nafziger, F.D., J.M. Widholm, H.C. Steinrücken and J.L. Killmer**, 1984. Selection and characterization of a carrot cell line tolerant to glyphosate. *Plant Physiol.*, **76**, 571-574.
  15. **Oetteimeier, W. and K. Masson**, 1990. Synthesis and thylakoid membrane binding of the radioactivity labeled herbicide minoseb. *Pestic. Chem. Physiol.*, **14**, 86-97.
  16. **Pipke, R. and N. Amrhein**, 1988. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate by *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1293-1296.
  17. **Pipke, R., N. Amrhein, G. S. Jacob, J. Schaefer and G. M. Kishore**, 1987. Metabolism of glyphosate in an *Arthrobacter* sp. GLP-1. *Eur. J. Biochem.*, **165**, 267-273.
  18. **Pipke, R. and N. Amrhein**, 1988. Isolation and characterization of a mutant of *Arthrobacter* sp. strain GLP-1 which utilizes the herbicide glyphosate as its sole source of phosphorus and nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2868-2870.
  19. **Rogers, S.G., L.A. Brand, S.B. Holder, E.S. Sharps and M.J. Brackin**, 1983. Amplification of the *aroA* gene from *Escherichia coli* results in tolerance to the herbicide glyphosate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 37-43.
  20. **Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis**, 1989. Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.
  21. **Steinrücken, H.C. and N. Amrhein**, 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **94**, 1207-1212.
  22. **Steinrücken, H.C., A. Schulz, N. Amrhein, C.A. Porter and R.T. Fraley**, 1986. Overproduction of 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase in a glyphosate-tolerant *Petunia hybrida* cell line. *Arch. Biochem. Biophys.*, **244**, 169-178.

(Received January 6, 1992)

(Accepted February 7, 1992)

**ABSTRACT: Isolation of Glyphosate Resistant *Pseudomonas* sp. Strain HG-1 and Cloning of Glyphosate Resistant Gene**

Lee, B.C.<sup>1</sup>, H.B. Cho, Y.G. Chai<sup>2</sup> and Y.K. Choi\*(Dept. of Biology, <sup>1</sup>Genetic Engineering, <sup>2</sup>Biochemistry, Hanyang University, Seoul, Korea)

From the soil environment which is treated with herbicides, we isolated strain having high resistance against glyphosate. After being identified, the isolated strain was turned out to be *Pseudomonas cepacia* and to have intense tolerance to the 10 mM glyphosate. The isolated strain shows slow growth rate about twenty hours in glyphosate comparing with that in inorganic phosphate. As a result of confirming the position of glyphosate resistant gene, it was proved to exist in chromosome. After cloning it into *E. coli* C600, transformants *E. coli* THG-101 and plasmid pGR19 were obtained.