

생물방제균 *Bacillus* sp. YBL-7의 형질전환조건

한길환 · 정병곤¹ · 김상달*

영남대학교 응용미생물학과, ¹대구직할시 보건환경연구원

Genetic Transformation of Biocontrol Agent *Bacillus* sp. YBL-7 by Plasmid pE194

Han, Kil-Hwan, Byung-Gon Jung¹ and Sang-Dal Kim*

Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

¹Microbiology Div., Taegu Institute of Health and Environment, Taegu 707-090, Korea

Abstract — *Bacillus* sp. YBL-7 which had been isolated from ginseng root-rot suppressive soil was able to antagonize *Fusarium solani* causing ginseng root-rot by their antibiotic substance. In order to develop multifunctional antagonist on *Bacillus* sp. YBL-7 as a biocontrol agent against *Fusarium solani*, optimal conditions for protoplast transformation system of *Bacillus* sp. YBL-7 by the vector plasmid pE194 were investigated. The protoplasts of *Bacillus* sp. YBL-7 were obtained at best efficiency by treatment with 200 µg/ml of lysozyme in the pH 7.0 of SMM buffer for 90 minutes at 40°C. The cell wall of the protoplast was regenerated on the agar plate containing 1.2% agar and 0.7 M mannitol. Under the best condition for protoplast formation and regeneration, the optimal transformation was achieved with 40% polyethylene glycol (M.W. 4000) treatment for 10 minutes. The vector plasmid pE194 showed the best transformation frequency at 5 µg/ml of final concentration. The pE194 was very stable over 80% in the transformants.

화학농약의 과용과 오용에 의한 생태계 파괴 및 공해 문제를 감소시키기 위해 근래에는 식물병원균에 대한 무공해 방제법의 개발이 활성화되고 있다(1,2). 이러한 노력의 하나로 최근에는 농작물 병충해 방제에 미생물을 이용하는 생물학적 방제 방법이 활발히 연구되고 있다(3,4). 이러한 생물학적 방제 연구의 일환으로 본인 등(5)은 저병해 인삼경작지 토양에서 식물근부균인 *Fusarium solani*에 대한 길항작용이 아주 강한 한 균주를 분리, 선발하였으며, 이를 동정한 결과 *Bacillus subtilis* 근연종임을 알 수 있었고, 그 방제기작이 항생물질에 의한 길항작용으로 추정할 바 있다(5). 선발된 방제균 *Bacillus* sp. YBL-7을 보다 더 강력하고 다기능적인 생물방제균으로 개발하기 위해서는 siderophore 생산능(6), chitinase 생산능 등(7) 다른 방제기작을 유전공학적으로 부가해야 할 필요가 있다고 생각되어진다. 따라서 본 연구

에서는 선발된 생물방제균 *Bacillus* sp. YBL-7을 host로 하고 plasmid pE194를 vector로 이용해서 protoplast transformation 방법(8)에 의해 외부 유전자의 형질도입 system을 확립하고자 하였으며 이때 필요한 여러가지 transformation 조건들을 조사함으로써 향후 유전자 조작 기법에 의한 생물방제균 개발의 기초를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 plasmid

본 실험에 사용된 균주는 인삼근부균인 *Fusarium solani*의 생육을 억제하는 *Bacillus* sp. YBL-7을 host로 사용하였으며, plasmid vector로는 *Bacillus subtilis* BD170(*trpC2*, *thr-5*)내에 내재된 *Staphylococcus aureus* 유래의 erythromycin에 내성을 가지는 3.5 Kb의 pE194 plasmid(24)를 형질전환에 사용하였다.

Key words: Biocontrol, *Bacillus*, pE194

*Corresponding author

배지

원형질 재생용배지(9)로는 mannitol 배지인 caseino acid 2g, yeast extract 2g, agar 3.2g, 1 M mannitol 280 ml, gelatin 8g, 50% glucose 4 ml, 1 M MgCl₂ 8 ml, 5% K₂HPO₄ 40 ml, 증류수 60 ml를 넣은 배지를 pH 7.0로 맞춘 다음 121°C 에서 15분간 멸균하여 사용하였다. Lysozyme 반응시에는 SMM buffer (0.5 M sucrose, 0.02 M malate, 0.02 M MgCl₂)를 사용하였으며, 삼투압안정제로서는 SMMP 용액(2× SMM와 4×Penassay broth를 동량 혼합)을 사용하였다.

원형질체 형성 및 재생

원형질체 형성은 Penassay broth 50 ml 배양액내에 종 배양액(3×10⁸/ml)을 1%되게 접종한 후 30°C 에서 160 rpm으로 5시간 배양한 후 원심분리하여 균체를 수거하고 SMMP 용액으로 2번 세척한 후 lysozyme (200 µg/ml)으로 37°C 에서 90분간 반응시켰으며, 원형질체 재생은 형성된 원형질체를 mannitol regeneration agar(MRA) 배지상에서 30°C 에서 4일간 배양하여 재생시켰다. 원형질체 형성율은 원형질체화된 세포수를 lysozyme 처리전의 세포수로 나눈 값을 백분율로 나타내었으며, 재생율은 MRA 배지에서 나타난 colony 수에서 원형질체화되지 않은 세포수를 뺀 값으로 나누어 백분율로 나타내었다.

형질전환

Bacillus sp. YBL-7의 형질전환은 Cohen 등(8)의 방법에 준하여 수행하였으며 원형질체의 형질전환 빈도는 erythromycin 10 µg/ml 농도를 포함한 MRA 배지에서 배양된 colony 수를 항생제를 포함하지 않은 MRA 배지에서 배양된 colony 수로 나눈 값으로 나타내었다.

Transformant로부터 plasmid 분리 및 확인

Plasmid vector pE194에 의해 형질전환된 transformants내에서의 plasmid의 분리는 Birnbiom과 Doly의 방법(10)에 따랐으며, 0.8% horizontal agarose gel 상에서 5 V/cm 약 2시간 전기영동하여 ethidium bromide(1 mg/ml)로 15분간 염색 후 UV illuminator (TR-302, 302 nm)상에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

***Bacillus* sp. YBL-7의 원형질체 형성조건**

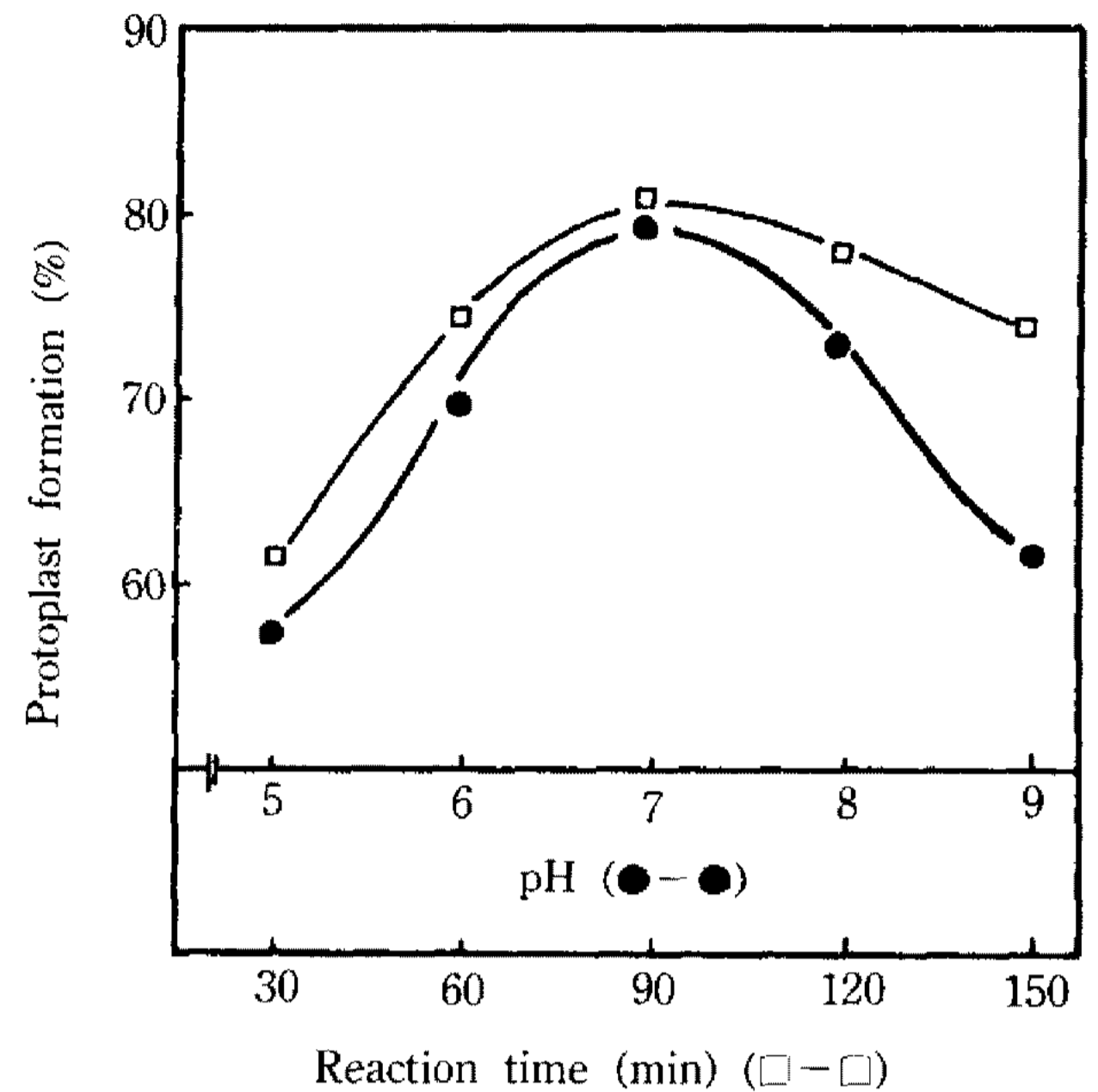


Fig. 1. Effect of pH and reaction time on the protoplast formation by lysozyme.

pH의 영향: 원형질체 형성 과정에서 lysozyme (200 µg/ml) 처리시 pH에 의한 원형질체 형성율의 영향을 조사해 보기위해 각 pH별로 lysozyme을 처리하여 반응시켜 본 결과 Fig.1에서 나타난 것과 같이 pH 7.0에서 가장 높게 나타났다. 이 결과는 *Bacillus* sp. K-17의 원형질체 형성율이 pH 7.0에서 가장 높다는 성 등의 보고(11)와 동일하게 나타났으며 또한 *Brevibacterium lactofermentum*의 경우 pH 7.5에서 가장 높게 나타났다는 보고(12)와도 유사하였다. 이러한 결과로 미루어 *Bacillus* sp. YBL-7 등 세균 세포벽에 대한 lysozyme의 작용 pH는 중성 부근이 가장 효과적이라는 것을 알 수 있다.

Lysozyme 처리시간의 영향: Lysozyme 처리에 의한 균체의 원형질체 형성시 세포벽의 제거 정도에 따라서 재생율과 형질전환율이 크게 영향을 받는다 (13). 따라서 원형질체 형성이나 형질전환에 가장 효율적인 원형질체를 얻기 위하여 37°C 에서 lysozyme (200 µg/ml)을 시간별로 처리하면서 원형질체 형성율을 조사해 본 바 Fig.1과 같이 90분간의 처리에서 원형질체 형성율이 80% 이상의 높은 형성율을 나타내었다. 이 결과는 *Bacillus subtilis*의 경우 45분간 (250 µg/ml) 처리(13), *Streptomyces cattleya*의 경우 90분간(2.5 mg/ml) 처리(14), *Staphylococci*의 경우 3시간(2 mg/ml) 처리(15)에서 최고치를 나타낸다는 보고에서와 같이 균종에 따라서 lysozyme 농도와 반응 시간이 다소 차이가 있으나 *Bacillus*속의 경우

90분간(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 처리에서 가장 좋은 형성율을 나타내었다는 보고(8)로 미루어 볼 때 90분 처리가 가장 효과적이라고 생각된다.

배양시간의 영향 : 생물방제균 *Bacillus* sp. YBL-7의 생육시기에 의한 원형질체 형성의 영향을 조사하기 위하여 15시간 진탕배양시킨 전 배양액 1%를 Penassay broth에 접종하여 30°C에서 배양시키면서 각 배양시간별 균체에 lysozyme(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리해 본 결과 원형질체 형성율은 Fig. 2에서 나타난 것과 같이 5시간 배양균체에서 최고의 형성율을 나타내었다. 이러한 결과는 4시간에서 5시간 배양시 최고의 형성율을 갖는다는 *Bacillus* sp. K-17의 결과(11)와, 4시간에서 6시간 배양시 최고의 형성율을 갖는다는 *Bacillus subtilis*의 결과(8)와 유사하였다. 이 결과는 6시간 이상 배양시킬 경우 배양시간이 연장됨에 따라 세포벽의 두께가 신장되어 원형질체 형성에 악영향을 미친다는 보고(16)를 뒷받침 할 수 있었다.

Sucrose 농도에 의한 영향 : Protoplast 형성시 자주 사용되는 삼투압안정제로 sucrose(17)의 농도가 원형질체 형성율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 sucrose 농도를 0.3 M에서 0.7 M까지 조절하여 원형질체 형성율을 조사한 결과 Fig. 2에서 나타난 것과 같이 0.5 M sucrose 농도에서 최대의 원형질체 형성율을 나타내었다. 이 결과는 *Bacillus megaterium*의 0.2 M(18)과 *Staphylococci*의 0.7 M(14)에서 가장 효과가 높았다는 결과와는 다소 상이하나, *Bacillus sub-*

tilis(8, 17)와 *Streptococcus lactis*(21)의 경우 0.5 M의 sucrose 농도에서 최고의 원형질체 형성율을 갖는다는 보고와 일치하였다.

원형질체 재생조건

Agar 농도에 의한 영향 : 원형질체로된 세포는 형질전환율을 높이기 위해서는 궁극적으로 재생율이 높아야 한다. 여기서 agar 농도는 원형질체의 안정성에 큰 영향을 미치므로 재생용 배지에 포함된 agar 농도가 원형질체 재생에 미치는 영향을 조사해 본 결과 Fig. 3에 나타난 것과 같이 1.2%의 agar를 첨가했을 때 최고의 재생율을 나타내었다. 이 결과는 *Bacillus* sp. K-17의 경우 0.8%와 *Staphylococci*의 경우 0.4%의 agar 첨가에서 최고의 재생율을 나타낸다는 보고(12)와는 다소 차이는 있으나, *Bacillus subtilis*의 경우 1.2% 첨가로서 최고의 재생율을 나타낸다는 Akamatsu 등의 보고(19)와는 아주 유사하게 나타났다.

Mannitol 농도 : 원형질체 재생시에 삼투압안정제로 관여하는 mannitol이 생물방제균 *Bacillus* sp. YBL-7의 원형질체 재생에 어떤 영향을 미치는가를 조사하기 위해 mannitol 농도를 0.4 M에서 1.2 M까지 되게 첨가하여 재생율을 조사한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 0.7 M에서 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 김(9) 등이 보고한 mannitol 첨가 농도와 일치하는 것으로 확인되었는데 일반적으로 세균세포의 삼투압과 등장조건에 가까운 mannitol이 0.7 M 정도

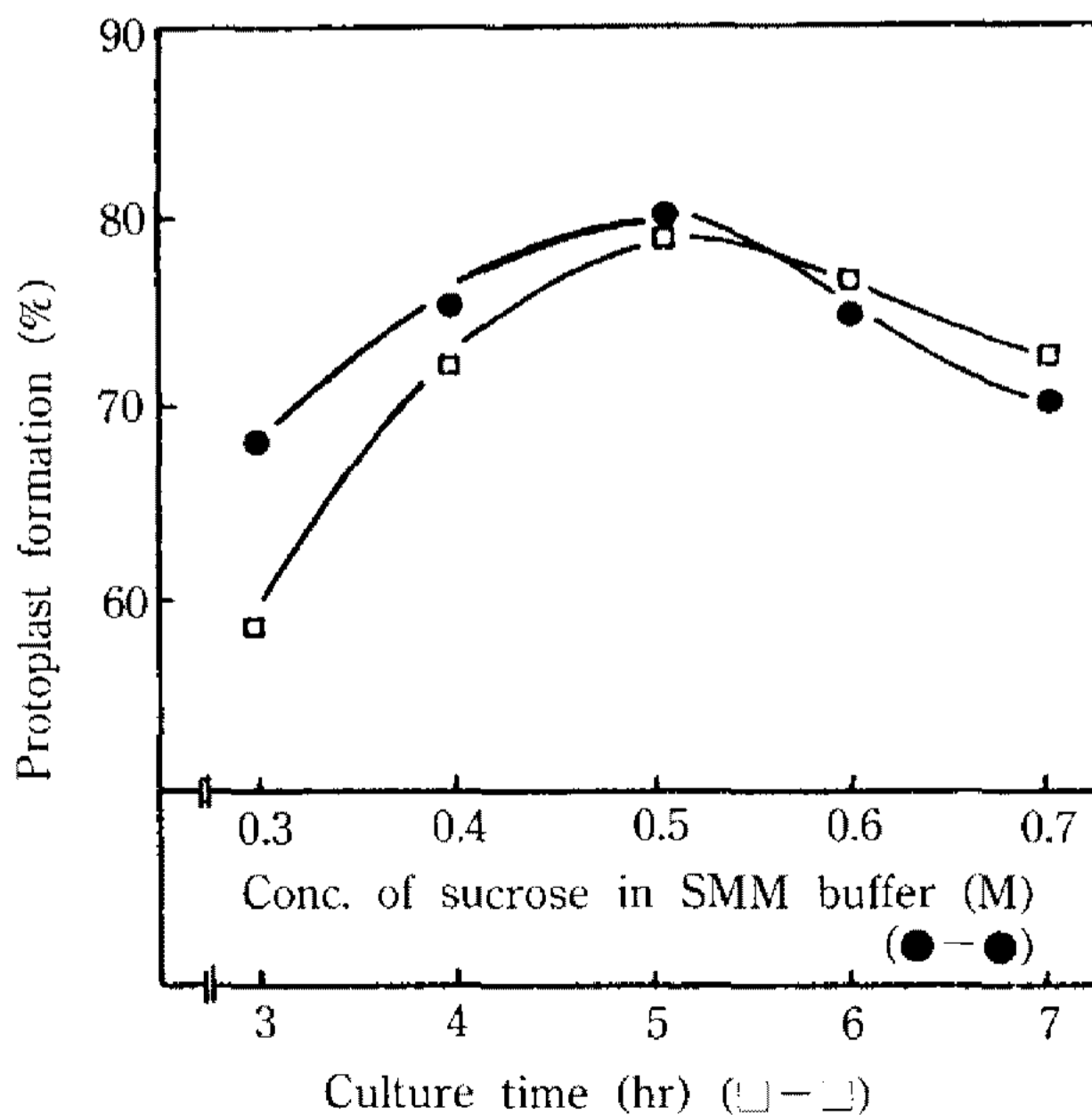


Fig. 2. Effect of sucrose concentration and culture time on the protoplast formation.

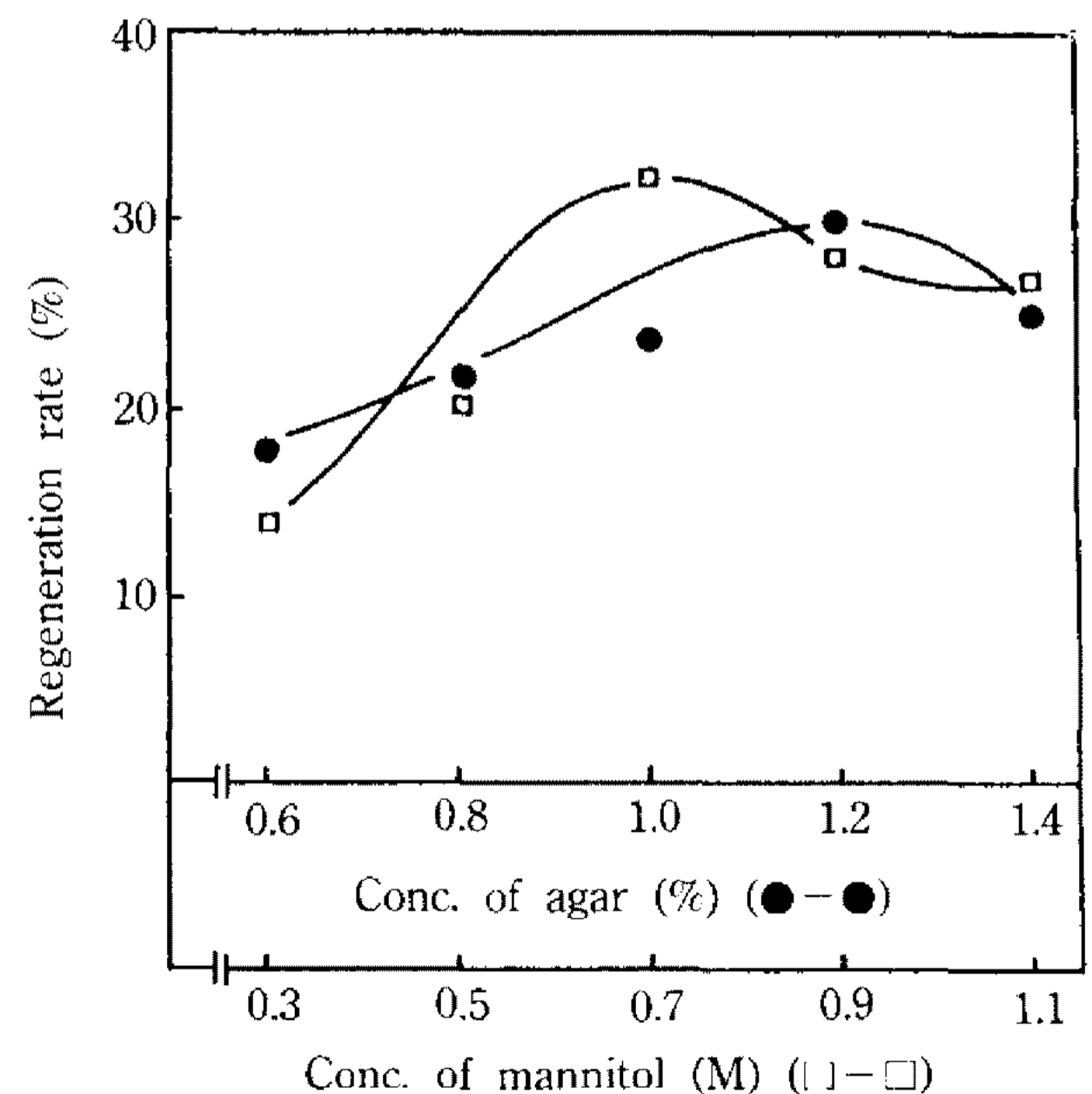


Fig. 3. Effect of agar and mannitol concentration on the regeneration.

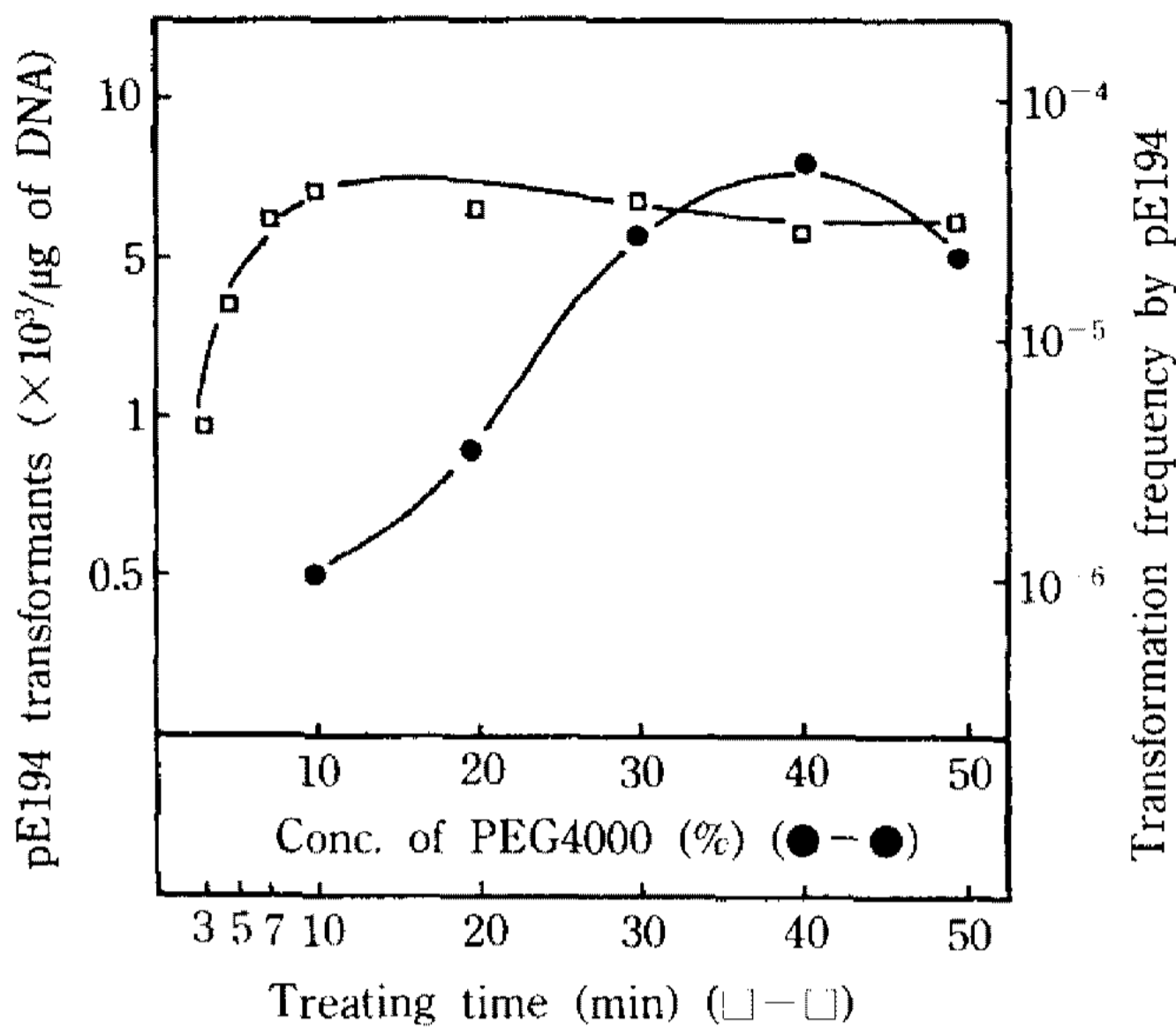


Fig. 4. Effect of PEG4000 concentration and treating time on the transformation of *Bacillus* sp. YBL-7 by pE194.

의 농도가 세포벽재생에 있어서 가장 적합하다고 추측할 수 있다.

형질전환조건

PEG4000농도의 영향 : 일반적으로 polyethylene glycol(PEG)에 의해 형질전환이 유도되는 확실한 기작은 밝혀져 있지 않으나, PEG가 DNA의 세포벽 투과를 유도하거나 DNA 분자의 형태학적 변화를 유도한다는 보고(20, 21)가 있으므로 본 실험에서도 생물방제균 *Bacillus* sp. YBL-7의 형질전환시 DNA 도입에 중요한 역할을 한다는 PEG를 이용하여 형질 전환율에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 4에서 나타난 결과와 같이 PEG(MW4000)농도를 40%로 첨가했을 경우 가장 그 형질전환율이 높게 나타났다. 이 결과는 *Streptomyces*의 경우 PEG 농도가 20%에서 가장 높게 나타났다는 Bibb 등의 보고(20)와 *B. lactofermentum*, *Streptococcus lactis*의 경우 25%에서 가장 높게 나타났다는 보고(12, 21)와 상이하였으나, 대부분의 *Bacillus*속의 경우는 일반적으로 PEG를 40% (w/v)로 첨가할 때 가장 형질전환율이 높다는 보고(7)들로 미루어 보아 생물방제균 *Bacillus* sp. YBL-7의 경우도 다른 *Bacillus*와 같이 40%의 PEG 농도에서 가장 형질전환율이 높다고 사료된다.

Plasmid DNA의 접촉시간 : PEG의 유도에 의한 plasmid DNA의 균체내 도입시 균체와 DNA의 접촉 시간이 DNA의 도입율에 미치는 영향을 알아보기

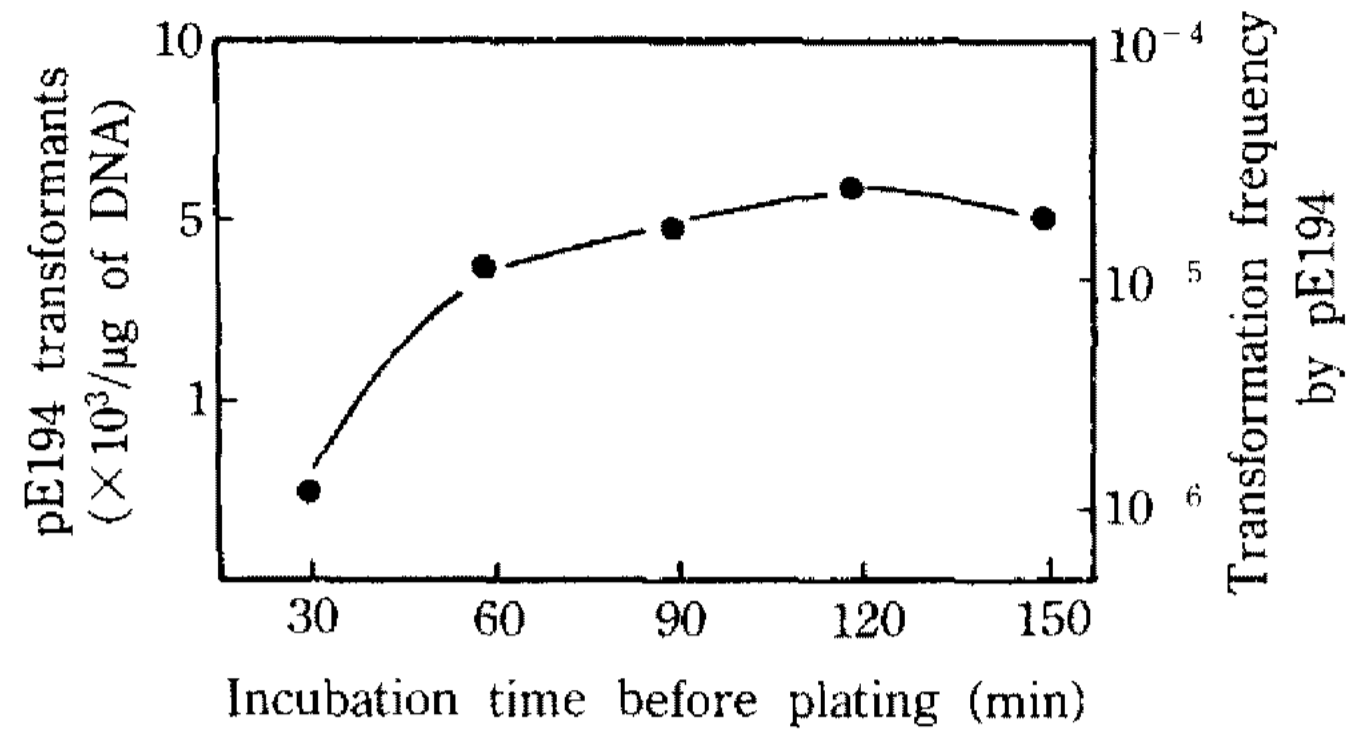


Fig. 5. Effect of incubation time before plating on the transformation.

위하여 생물방제균 *Bacillus* sp. YBL-7의 원형질체에 plasmid DNA인 pE194의 도입에 걸리는 시간을 조사해 본 결과 Fig. 4에서 나타난 것과 같이 10분 동안 4°C에서 놓아 두었을 경우 가장 높은 형질전환율을 나타내었다. 이와같은 결과는 *Streptococcus lactis*의 경우 20분간의 접촉(21)과 *Bacillus megaterium*의 경우 2~3분 접촉으로 가장 높은 형질전환율을 나타낸다는 보고(22)와는 상이하나 생물방제균 *Bacillus* sp. YBL-7의 경우는 10분 정도 접촉시키는 것이 가장 좋다고 사료된다. 또한 온도에 있어서는 상온에서와 4°C에서의 반응이 차이가 없는 것으로 확인되었다.

발현시간 : DNA 도입 후 항생제 내성인자의 발현에 필요한 시간을 알기 위하여 PEG 유도로 DNA를 도입시킨 후 SMMP로 세척하고 이어 전배양 시간별로 그 형질전환율을 조사한 결과 Fig. 5에서 나타난 것과 같이 30°C에서 120분간 전배양시킬 경우 가장 높게 나타났다. 이 결과는 방선균 *Streptomyces lactis*의 30분 배양으로 그 효과가 가장 높다는 Kondo 등의 보고(21)와 큰 차이가 있으나 *Bacillus subtilis*의 경우 90분 이후가 가장 높다는 보고(8)와 비슷한 결과를 나타내었다.

DNA농도별 형질전환율 : DNA농도가 형질전환율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 DNA농도를 각각 0.1 μg/ml에서 25 μg/ml로 첨가하여 형질전환시켜 본 결과 Fig. 6에서 나타난 것과 같이 5 μg/ml 이상의 농도에서 최고의 형질전환율을 나타내었다. 이와같은 결과는 다른 *Bacillus*속들의 50 ng/ml에서 최고의 형질전환율을 나타낸다는 보고(21)와 상이하나 *Bacillus megaterium*의 경우 5 μg/ml에서 가장 높은 형질전환율이 나왔다는 보고(22)와 *Bacillus subtilis*의 10 μg/ml의 DNA농도에서 형질전환율이 더 이상 증가되지 않는다는 결과(8)와 비슷하게 나타났다.

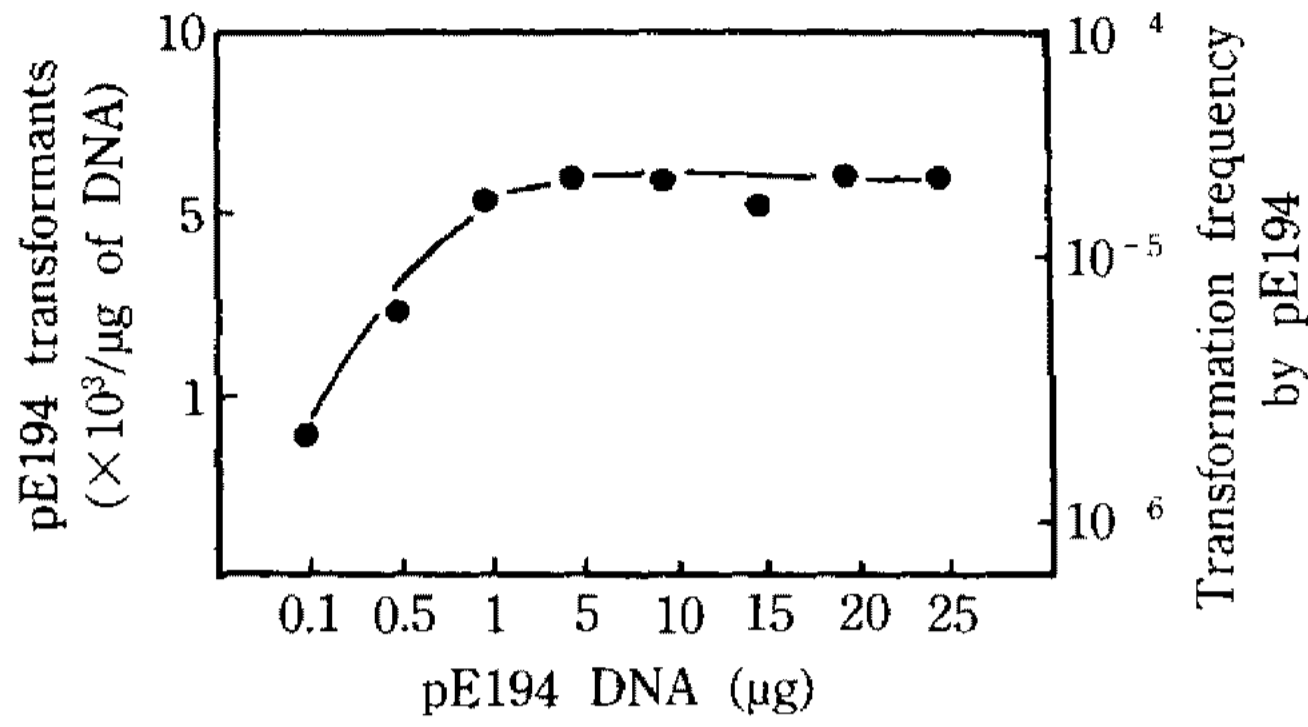


Fig. 6. Effect of pE194 amount on the transformation of *Bacillus* sp. YBL-7.

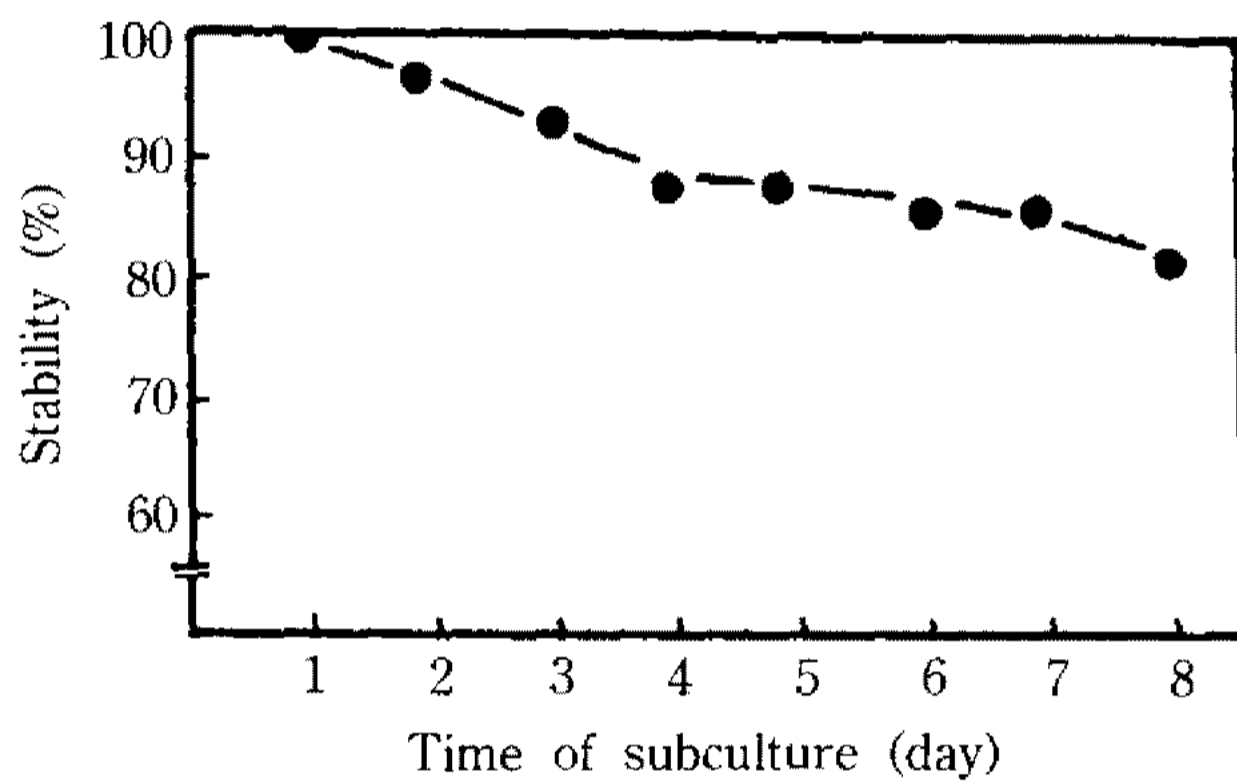


Fig. 7. Plasmid stability in the transformants of pE194.

Plasmid의 안정성 및 확인

생물방제균 *Bacillus* sp. YBL-7이 plasmid pE194에 의해 형질전환된 후 그 transformants내에서 plasmid가 어느 정도 안정하게 유지되는가를 조사하기 위하여 erythromycin이 함유되어 있지 않은 LB agar 평판배지상에서 계속해서 계대배양시킨 후 항생물질에 대한 내성형질 상실빈도를 replica법으로 조사하였으며 이 상실빈도를 백분율로 나타내 본 결과 Fig. 7과 같다. 여기서 나타난 결과와 같이 8일 동안 매일 계대배양하여도 80% 이상의 높은 내성형질을 유지하였다. 이와같은 결과는 *B. subtilis*내에서 pTB90의 안정성이 약 33% 밖에 미치지 못한다는 보고(23)에 비해 생물방제균 *Bacillus* sp. YBL-7내에서 plasmid pE194은 아주 안정하게 유지되는 것으로 사료된다. 또한 외부의 유전자 도입된 형질전환체와 숙주균주인 *Bacillus* sp. YBL-7의 식물근부균 *Fusarium solani*에 대한 억제능을 비교한 결과 숙주균주와 동일한 억제력을 유지하는 것으로 확인되었다. 한편 형질전환된 transformants내에서의 pE194의 존재를 확인하기 위하여 5회 계대배양된 생물 방제균 *Bacillus* sp. YBL-7(pE194)로부터 Birnboim 등의 방법(10)에 의하여

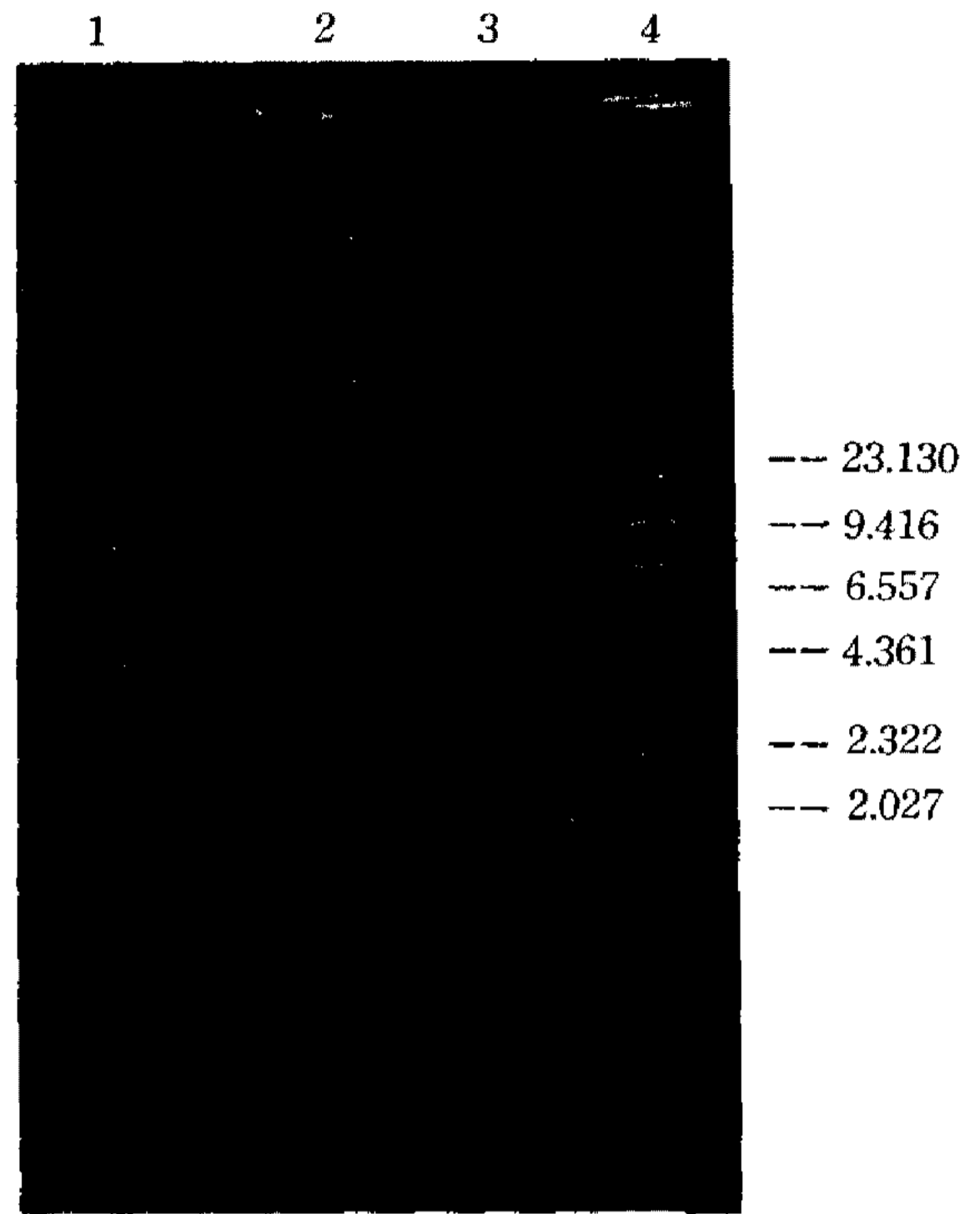


Fig. 8. Agarose gel electrophoresis of pE194 plasmid DNA obtained from the transformant of *Bacillus* sp. YBL-7.

Lane 1: *Bacillus subtilis* BD170(pE194), 2: transformant of *Bacillus* sp. YBL-7 with pE194, 3: *Bacillus* sp. YBL-7, 4: λ-DNA digested with *Hind*III.

plasmid를 분리하여 0.8%의 agarose gel에 의해 전기영동해 본 결과 Fig. 8과 같이 pE194의 고유 band를 확인할 수 있었다.

요 약

식물근부균 *Fusarium solani*의 생육을 강력히 길항하는 *Bacillus* sp. YBL-7을 토양으로부터 분리하였으며 그 길항기작이 항생물질임을 이미 보고하였다. 분리된 생물방제균 *Bacillus* sp. YBL-7 균주를 siderophore, 가수분해능 등의 타 방제기능을 도입할 수 있는 다기능적인 방제균으로 육종하기 위해 plasmid vector pE194를 이용하여 효율적인 형질전환 system을 확립하고자 하였으며, 이때 필요한 여러가지 조건을 조사하였다. 생물방제균 *Bacillus* sp. YBL-7 원형질체 형성의 최적조건은 5시간 배양된 균체를 사용함으로써, 최종농도가 200 µg/ml인 lysozyme을 37°C에서 90분간 처리함으로써 원형질체 형성율이 가장 높았다. 삼투압안정 완충제인 SMM buffer내의 sucrose 농도는 0.5 M에서 안정하였고, mannitol 재생배지에서 원형질체를 재생시켰을 경우 첨가된 agar의

농도가 1.2%에서, mannitol은 0.7 M의 농도에서 가장 재생율이 높았다. 형질전환율은 polyethylene glycol 농도가 40%(w/v)일 때 가장 높았으며, plasmid DNA와의 접촉시간과 발현배양시간은 각각 10분, 120분에서 가장 효과가 좋았다. 또한 plasmid DNA의 농도는 5 µg/ml 첨가에서 가장 높았으며, 형질전환된 숙주균주 *Bacillus* sp. YBL-7내에서의 pE194는 매우 안정하게 유지되었으며, 외부유전자가 도입된 전환체와 숙주균주가 동일한 억제력을 갖는 것으로 확인되었으며, agarose gel상에서도 고유의 plasmid pE194의 band를 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Baker, R. 1985. *Biological Control in Agriculture IMP System*, Pp. 25-39. Academic Press, Inc.
2. Cook, R.J. 1985. Biological control of pathogens: theory to application. *Phytopathol.* **75**: 25-29.
3. Henis, Y. and I. Chet. 1975. Microbial control of plant pathogens. *Adv. Appl. Microbiol.* **19**: 85-111.
4. Papavizas, G.C. and R.D. Lumsdem. 1980. Biological control of soilborne fungal propagules. *Annu. Rev. Phytopathol.* **18**: 389-413.
5. 임호성, 김상달: 한국과학재단보고서, p37 (1990).
6. Marilyn, D.M., J.C. Moores and J. Leong. 1986. Cloning of the gene coding for the outer membrane receptor protein for Ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth-promoting *Pseudomonas* strain. *J. Biol. Chem.* **216**: 795-799.
7. Shapira, R., A. Ordentlich, H. Chet and A.B. Oppenheim. 1989. Control of plant diseases by chitinase expressed from cloned DNA in *Escherichia coli*. *Phytopathol.* **79**: 1246-1249.
8. Chang, S. and S.N. Cohen. 1979. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* **168**: 111-115.
9. Kim, S.D. and J. Spizizen. 1985. Transformation of *Bacillus subtilis* protoplast by recombinant plasmid DNA. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**: 345-348.
10. Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
11. 성낙계, 정운상, 고헌룡, 정정희. 1987. 호알칼리성 *Bacillus*속 K-17 의 형질전환조건. 산업미생물학회지 **17**: 213-218.
12. Santamaria, R.I., J.A. Gil and J.F. Martin. 1985. High-frequency transformation of *Brevibacterium lactofermentum* protoplasts by plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **162**: 463-476.
13. Akamatsu, T. and J. Sekiguchi. Transformation of *Bacillus* protoplasts by plasmid pTP4 DNA. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 1617-1621.
14. Song, E.K. and Y.H. Park. A study on optimal conditions for protoplast formation and regeneration of *Streptomyces cattleya*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 61-67.
15. Lindberg, M., S. Ahrne and F. Gotz. Plasmid transfer and genetic recombination by protoplast fusion in *Staphylococci*. *J. Bacteriol.* **145**: 74-81.
16. Frehel, C., A.M. Lheritier, R.C. Sanchez and P. Schaeffer. 1979. Electron microscopic study of *Bacillus subtilis* protoplast fusion. *J. Bacteriol.* **137**: 1354-1361.
17. Gabor, M.H. and R.D. Hotchkiss. 1979. Parameters governing bacterial regeneration and genetic recombination after fusion of *Bacillus subtilis* protoplasts. *J. Bacteriol.* **37**: 1346-1353
18. Foder, K. and L. Alfoldi. 1976. Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**: 2147-2150.
19. Akamatsu, T. and J. Sekiguchi. 1981. Studies on regeneration media for *Bacillus subtilis* protoplasts. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 2887-2894.
20. Ward, J.M., M.J. Bibb and D.A. Hopwood. 1978. Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. *Nature* **274**: 398-400.
21. Kondo, J.K. and L.L. McKay. 1984. Plasmid transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts: Optimization and use in molecular cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 252-259.
22. Vorobjeva, I.P., I.A. Khmel and I. Alfoldi. 1980. Transformation of *Bacillus megaterium* protoplasts by plasmid DNA. *FEMS Lett.* **7**: 261-263.
23. Imanaka, T., M. Fujii, I. Aramori and S. Aiba. 1982. Transformation of *Bacillus stearothermophilus* with plasmid DNA and characterization of shuttle vector plasmids between *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **149**: 824-830.
24. Shivakuma, A.G., J.G. Thomas, Y.I. Kozlov, and D. Dubnau. 1980. Organization of the pE194 genome. *Mol. Gen. Genet.* **179**: 241-252.

(Received July 27, 1992)