

Pseudomonas syringae pv. *tabaci* Phage의 분리 및 특성에 관한 연구

전흥기 · 김태인 · 유진삼 · 백형석*

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

자연계로부터 식물병원균인 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*에 감염하는 bacteriophage를 분리하였다. 이 phage의 안정성을 조사한 결과 중성 부근 pH에서 가장 안정하였고 50°C 이상에서는 안정성이 급격히 감소하였으며 흡착시간 별로는 10분까지는 빠른 흡착율을 보이다가 그 후부터는 서서히 감소하였다. 또한 흡착에는 금속이온을 필요로 하였으며 흡착온도는 20°C에서 가장 높게 나타났고 흡착시간은 20~40분에서 가장 높게 나타났다. 또한 배양온도에 따라 plaque 양상이 달랐는데 10°C에서는 clear plaque를, 20, 30°C에서는 turbid plaque를 형성하였다. 20°C에서 잠복기는 약 3시간이었고 평균 방출수는 200 PFU/cell이었다. 유전물질로는 ds DNA를 가지고 있었고 크기는 30 Kb 정도이었다.

KEY WORDS □ *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, bacteriophage, turbid plaque

Pseudomonas syringae group에는 여러가지 식물병원균이 있으며 이들 균주 중에서 콩과 담배잎에 세포의 독소를 생성하여 야화병(halo blight, chlorosis)이라 알려진 식물병을 일으키는 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*가 있다(10, 13, 18, 21). 야화병 유발과 관계되는 이균의 독소는 tabtoxin이라 부르는데 이 독소는 glutamine synthetase의 작용을 비가역적으로 저해한다(22). *P. syringae*가 생산하는 tabtoxin의 구조도 잘 정립되어 있고 그것의 저해기작도 잘 이해되고 있으나 병원성기작에 대한 유전학적 측면에서의 연구는 최근에 들어서야 진행되고 있다. Piwowski와 Shaw 등은 *P. syringae* pv. *tabaci*의 한 균주가 plasmid를 가지고 있으나 이것은 tabtoxin의 생성과 병원성의 어떠한 면에도 관여하지 않는 것 같다고 보고하였으며, 이러한 보고는 *P. syringae* pv. *phaseolicola*에 의한 phaseolotoxin 생성이 plasmid에 의해 유도된다는 결과와는 상반된 것이다(7). *P. syringae*의 경우 pathotype에 따라 phage에 대한 감수성이 달라 여러가지 phage를 분리하여 phage typing에도 응용하고 있다. 그러나 phage가 숙주균에 감염됨에 따라 숙주균의 병원성에 영향을 줄 수도 있기 때문에 본 연구에서는 *P. syringae* pv. *tabaci*를 숙주로 하는 phage를 자연계로부터 분리하여 phage의 생리적 및 유전적 특성을 알아보고 phage의 감염이 숙주균의 toxin 생성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

본 실험에서 사용한 균주는 Wisconsin University의 Richard D. Durbin으로부터 제공받은 *P. syringae* pv. *tabaci* Tox⁺(pt113) 균주와 Tox⁻(pa45) 균주이며 NBYE 배지(1 l 수용액에 nutrient broth 8 g, yeast extract 5 g의 조성)로 30°C에서 12~16 시간 진탕배양하여 사용하였다.

Phage의 분리, 보관 및 정제

P. syringae pv. *tabaci*의 phage 분리는 Crosse(4), Nordeen(12), Adams(1) 등의 방법에 따라서 다음과 같이 행하였다. 채취해온 토양을 멸균수에 현탁시키고 그 현탁액 또는 하수분리물을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리시킨 상등액을 pore size가 0.22 μm인 membrane filter로 무균여과한 뒤 0.1 ml를 취하여 대수 증식기의 균배양액 0.1 ml과 혼합하였다. 여기에 이가 금속이온의 최종농도가 0.001 M이 되도록(11) 한 뒤 30°C 항온조에서 30분간 흡착시켰다. 이것을 고품배지에 top agar와 혼합하여 증충한 뒤 30°C에서 하룻밤 배양하여 plaque 생성유무를 관찰하였다. 또한, plaque의 정량은 Adams(1959)의 증충법에 의한 용균반 계수법으로 행하였다.

Phage의 보관은 confluent lysis된 top agar에 phage buffer(0.01 M Tris, 0.01 M MgSO₄, pH 7.0)를 넣어 만든 plate lysate에 chloroform을 첨가하여 4°C 냉장고에 보관하고 일부는 DMSO(dimethyl sulphoxide, 7%)를 첨가하여 -70°C에 보관하였다(3).

Phage의 정제는 Ausubel 등(2)과 Nordeen 등(12)이 사용한 방법에 따라 plate lysate법에 의해 phage 액을 얻은 후 10% PEG(polyethylene glycol 6000)로 침전시킨 뒤 CsCl(1.5 g/ml) 밀도구배 초원심분리하여

정제하였다.

흡착율

10^6 cells/ml인 균액과 10^6 PFU/ml인 phage액을 2 ml씩 첨가한 뒤 30°C에서 흡착시키면서 5분 간격으로 50 μ 씩을 취하여 4.95 ml의 phage buffer에 희석하여 phage의 흡착을 정지시켰다. 이것을 12,000 $\times g$ 에서 3분간 원심분리하여 균에 흡착한 phage를 침전시킨 뒤 상등액의 phage를 희석하여 균액과 반응시켜 생성되는 plaque수로서 흡착율을 조사하였다.

흡착조건

금속이온의 영향: 10^6 PFU/ml인 phage액과 10^6 cells/ml인 균액을 반응시킨 뒤 각종 금속이온을 최종농도가 0.01 M(1가 이온) 혹은 0.001 M(2가 이온)이 되게 첨가한 뒤 흡착시켜서 생성되는 plaque수를 조사하였다. 이때 control로서 EDTA 0.001M을 사용하였다.

흡착온도: 10^6 PFU/ml인 phage액과 10^6 cells/ml인 균액을 첨가하여 10, 20, 30, 37°C 각각의 온도에서 흡착시켜 생성되는 plaque수를 조사하였다.

흡착시간: 10^6 PFU/ml인 phage액과 10^6 cells/ml인 균액을 첨가하여 30°C에서 흡착시키면서 10분 간격으로 중층접종하여 생성되는 plaque수를 조사하였다.

배양온도의 영향: 10^6 PFU/ml인 phage액과 10^6 cells/ml인 균액을 30°C에서 흡착시킨 뒤 중층접종하여 10, 20, 30, 37°C의 온도에서 배양하여 생성되는 plaques를 관찰하였다.

Phage의 일단증식실험

5×10^8 CFU/ml인 균액 0.9 ml과 5×10^7 PFU/ml인 phage lysate 0.1 ml을 20°C에서 30분간 흡착시킨 뒤 이것을 1:100으로 희석하여 일정시간마다 0.1 ml씩 취하여 phage수를 결정하였다.

Phage DNA의 분리

Phage DNA 분리는 정제된 phage액에 용균액(0.3% NaCl, 20 mM EDTA, 0.3% SDS)을 처리하여 용균시킨 다음 상등액에 동량의 buffered phenol, buffered phenol/chloroform으로 각각 1회씩 처리하여 단백질을 제거하고 2배 부피의 absolute ethanol을 넣어 -70°C에서 15분간 방치하여 DNA를 침전시켰다(2, 12).

Phage의 감염과 독소생성관계

Phage가 흡착된 균을 NBYE배지에 중층접종하여 10, 20, 30°C의 온도에서 배양하여 형성된 clear plaque와 turbid plaque상의 phage를 plaque 주위의 균과 함께 carborundum method로 이식후 2주 경과된 강남콩의 본잎(primary leaves)에 접종하였다(16).

결과 및 고찰

Phage의 분리 및 특성

하수로부터 분리한 phage는 직경이 1~2 mm의 turbid plaque를 형성하였으며 Ps-90으로 명명하였다. 형태를 알아보기 위해 Chicago University의 Robert V. Miller로부터 제공받은 *Pseudomonas aeruginosa* PAO를 숙주로 하는 bacteriophage D₃를 표준으로 하여 전자현미경하에서 비교 관찰하였다(Fig. 1, 2). Ps-90은 bacteriophage D₃와 거의 유사한 형태이나 다소 둥근모양의 두부와 짧은 미부로 구성되어 있고 돌기가 더 뚜렷한 형태이며 크기는 D₃보다 다소 작은 편이었다.

생리적 특성으로는 각 pH에서의 phage 안정성 검토를 위해 pH 3~10의 NBYE 액체배지에서 30°C로 1시간 동안 반응시킨 결과 pH 6에서 가장 안정하였으며 산성보다 염기성 조건에서 더 안정하였다(Fig. 3). 10~80°C의 온도에서 30초간 열처리했을



Fig. 1. Electron micrograph of bacteriophage D₃ (magnification, $\times 140,000$).



Fig. 2. Electron micrograph of bacteriophage Ps-90 (magnification, $\times 175,000$).

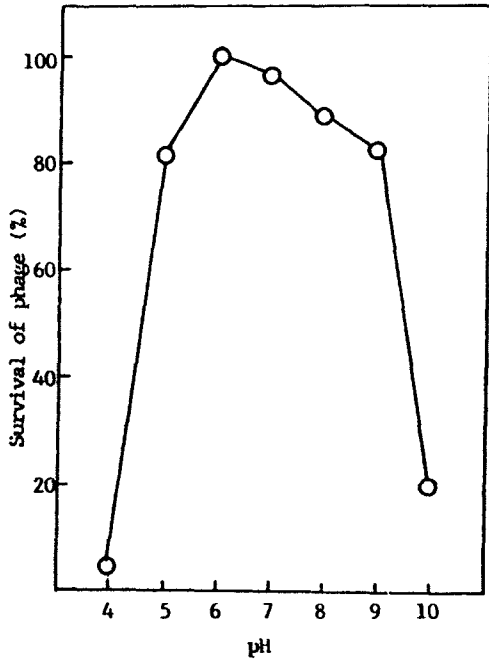


Fig. 3. Effect of pH on the stability of phage Ps-90.

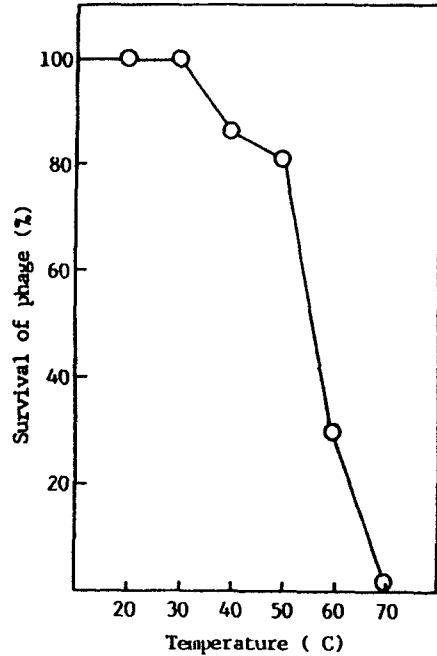


Fig. 4. Effect of temperature on the stability of phage Ps-90.

Table 1. Effect of metal ions on adsorption of phage Ps-90 to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Ion	Concentration (M)	Adsorption rate (%)
K ⁺	10 ⁻²	100.0
Na ⁺	10 ⁻²	95.7
Mn ⁺⁺	10 ⁻³	95.8
Mg ⁺⁺	10 ⁻³	91.0
Ca ⁺⁺	10 ⁻³	81.8
EDTA	10 ⁻³	0.8

The phage adsorption by K⁺ was represented as 100%.

Table 2. Effect of temperature on adsorption of phage Ps-90 to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Adsorption temperature (°C)	Adsorption rate (%)
10	98
26	100
30	80
37	76

The phage adsorption at 20°C was represented as 100%.

때의 phage 안정성은 30°C까지는 열에 안정하였으나 50°C 이상에서는 안정성이 급격히 감소하였다(Fig. 4). 균에 흡착한 phage를 침전시키고 상등액의 phage 수로써 흡착율을 조사한 결과 10분까지는 비교적 빠른 흡착율을 보였으며 시간이 경과함에 따라 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. Ps-90 phage의 흡착조건을 금속이온, 온도, 시간별로 검토한 결과는 다음과 같다. Phage가 균에 흡착하기 위해서는 금속이온이 필수적이었으며, 흡착온도는 20°C에서 가장 높게 나타났고 흡착시간은 20~40분에서 비교적 높게 나타났다(Table 1, 2, 3). Phage와 균액을 30°C에서 흡착시켜 중층집종한 평판배지를 배양온도별로 배양한 결과는 Table 4와 같았다. 각각의 온도에서 생성되는 plaque수는 거의 비슷하며 plaque 크기, 형태도 거의

Table 3. Effect of time on adsorption of phage Ps-90 to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Adsorption time(min.)	Adsorption rate(%)
0	47
10	65
20	100
30	96
40	90
50	69
60	65
80	63
100	49

The phage adsorption at 20 minutes was represented as 100%.

Table 4. Effect of incubation temperature on plaque morphology of phage Ps-90.

Incubation temperature (°C)	Plaque morphology
10	clear
20	turbid
30	turbid

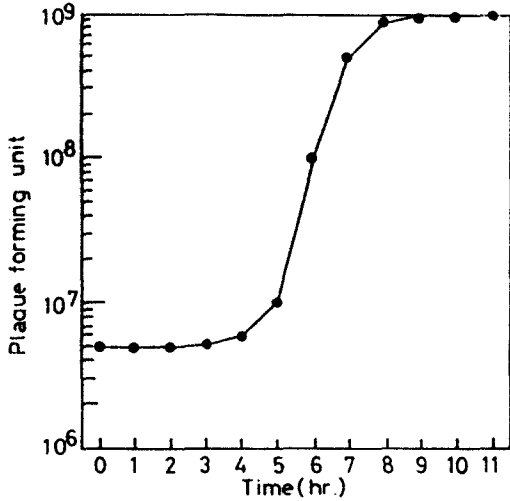


Fig. 5. Lysis of Ps90-infected cultures of *P. syringae*. A culture containing 10⁸ bacteria/ml was infected at a moi 0.1 and incubated at 20°C. At 30 min the culture was diluted 100-fold, and infective centers were determined at intervals during subsequent incubation.

같았다. 그러나 배양온도에 따라서 10°C에서는 clear plaque를 20, 30°C에서는 turbid plaque를 형성하였다. 37°C에서는 숙주균의 생육이 불가능하여 결과를 관찰할 수 없었다.

Phage의 일단증식실험결과는 Fig. 5와 같다. 잠복기가 3시간 정도로 비교적 길게 나타났으며 평균방출수는 200 PFU/cell 정도였다.

Phage DNA를 small scale로 분리한 후 size marker와 함께 전기영동한 결과 약 30 kb에 위치하는 DNA를 관찰할 수 있었고 DNase에 의해 분해되는 것으로 보아 DNA로 구성되어 있음을 알 수 있었으며, 제한효소로 처리하여 분해되는 것으로 보아 double strand라고 생각되었다. Phage DNA는 *HincII*, *PvuII*, *XhoI*, *SalI*, *BamHI*, 그리고 *BglII* 등에 의해서는 잘리지 않았고 *EcoRI*, *AclI*, 그리고 *XbaI*에 의해서는 잘렸다.

Phage 감염과 독소생성관계 검토

배양온도에 따라 다르게 나타난 clear plaque와

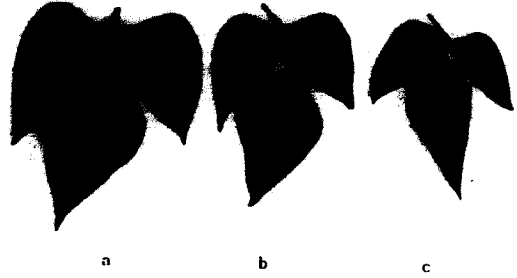


Fig. 6. Photographs of bean leaves with halo blight disease.

Plants were inoculated with (a) Tox⁺ stanin and clear plaque phage, (b) Tox⁺ stanin only, (c) Tox⁻ stanin and turbid plaque phage.

turbid plaque의 phage를 주위의 균과 함께 숙주식물에 접종한 결과 접종 5일 경과 후 turbid plaque에서 접종한 잎의 경우는 크고 뚜렷한 감염 halo를 볼 수 있었으며 control로서 Tox⁺균만 접종한 잎은 다소 작은 감염 halo를 그리고 clear plaque에서 접종한 잎의 경우는 control보다 더 작고 희미한 감염 halo를 볼 수 있었다(Fig. 6). 이로써 온도에 따라 lysogenic 혹은 lytic 상태로 존재하는 Ps-90이 *P. syringae* pv. *tabaci*에 감염함으로써 숙주식물에서 서로 다른 독성작용을 나타냄을 알 수 있었다. Lysogenic conversion이 여러가지 균에서 나타나고 있으므로 이 경우도 더욱 상세히 연구되어야 할 것이다.

사 사

이 논문은 1990년도 과학재단 지원연구비에 의해 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Adams, M.H., 1959. Bacteriophages. Interscience Publication Inc., N.Y.
2. 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. John Wiley & Sons, Inc., New York.
3. Berger, S.L. and A.R. Kimmel, 1987. Method in enzymology: Guide to molecular cloning techniques 152. Academic Press, Inc., New York.
4. Crosse, J.E. and M.K. Higorani, 1958. A method for isolating *Pseudomonas morsprunorum* phages from soil. *Nature* 181, 60-61.
5. Dillon, J.R., A. Nasim, and E.R. Nestmann, 1985. Recombinant DNA methodology. John Wiley & Sons, Inc., New York.

6. Durbin, R.D. and S.L. Sinden, 1967. The effect of light on symptomatology of oat halo blight. *Phytopathol.* 57, 1000-1001.
7. Gantotti, B.V., S.S. Patil and M. Mandel, 1976. Apparent involvement of a plasmid on phaseotoxin production by *Pseudomonas phaseolicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 511-516.
8. Knight, T.J., R.D. Durbin and P.J. Langston-Unkefer, 1987. Self protection of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* from its toxin, tabtoxinine- β -lactam. *J. Bacteriol.* 169, 1954-1959.
9. Maniatis, T., E. Fritsch, and J. Sambrook, 1990. Molecular cloning; A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
10. Mayer, J.M. and E.R. Stadtman, 1981. Glutamine synthetase of pseudomonads: Some biochemical and physicochemical properties. *J. Bacteriol.* 146, 705-712.
11. Matsumoto, H., Y. Itoch, S. Ohta, and Y. Terawaki, 1986. A generalized transducing phage of *Pseudomonas cepacia*. *J. Gen. Microbiol.* 132, 2583-2586.
12. Nordeen, R.D., M.K. Morgan, and T.C. Currier, 1983. Isolation and partial characterization of bacteriophages of phytopathogen *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1890-1898.
13. Obukowicz, M. and P.D. Shaw, 1985. Construction of Tn3-containing plasmids from plant-pathogenic pseudomonads and an examination of their biological properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 468-473.
14. Omer, M.E.H. and R.K.S. Wood, 1969. Growth of *Pseudomonas phaseolicola* in susceptible and resistant bean plants. *Ann. Appl. Biol.* 63, 103-116.
15. Peet, R.C., P.B. Lindgren, D.K. Willis and N.J. Panopoulos, 1986. Identification and cloning of genes involved in phaseolotoxin *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* 166, 1096-1105.
16. Peter, B.L., R.C. Peet, and N.J. Panopoulos, 1986. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *J. Bacteriol.* 168, 512-522.
17. Salch, Y.P. and P.D. Shaw, 1988. Isolation and characterization of pathogenicity genes of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *J. Bacteriol.* 170, 2584-2591.
18. Sinden, S.L. and R.D. Durbin, 1968. Glutamine synthetase inhibition: Possible mode of action of wildfire toxin from *Pseudomonas tabaci*. *Nature* 219, 379-380.
19. Staskawicz, B.J. and N.J. Panopoulos, 1979. Phaseolotoxin transport in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* via the oligopeptide permease. *Phytopathol.* 69, 663-666.
20. Staskawicz, B.J. and N.J. Panopoulos, 1980. A rapid and sensitive microbiological assay for phaseotoxin. *J. Bacteriol.* 142, 474-479.
21. Thomas, M.D. and R.D. Durbin, 1985. Glutamine synthetase from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. properties and inhibition by tabtoxinine- β -lactam. *J. Gen. Bacteriol.* 131, 1061-1067.
22. Unkefer, C.J., R.E. London, R.D. Durbin, T.F. Uchytel, and P.J. Langston-Unkefer, 1987. The biosynthesis of tabtoxinine- β -lactam. *J. Biol. Chem.* 262, 4994-4999.

(Received October 12, 1993)

(Accepted January 14, 1994)

ABSTRACT: Studies on the Isolation and Characterization of the *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* Phage

Jun, Hong Ki, Tae In Kim, Jin Sam You, and Hyung Suk Baik* (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea)

Pseudomonas syringae pv. *tabaci* produces tabtoxin and causes wildfire disease on tobacco and bean plants. In this study, bacteriophage of *P. syringae* pv. *tabaci* were isolated from sewage by top agar overlay method, and physiological and genetical characteristics of the phage were investigated. Plaques of isolated phage were turbid and ranged in size from 1 to 2 mm. The stability range of pH was between 6.0 and 9.0, and stability of temperature was up to 30°C and inactivated at 70°C. The adsorption rate of phage was about 85% for 30 min. The latent period and mean burst size as determined in one step growth experiments were 3 hrs and 200 PFU/bacterium, respectively. Genomic material of isolated phage was dsDNA of which size was about 30 kb.