

*Pseudomonas syringae*의 식물독소와 독소 생산 균주의 검출을 위한 PCR Primer

정재성¹ · 한호심¹ · 고영진*
순천대학교 응용생물학과, ¹생물학과

Phytotoxins of *Pseudomonas syringae* and PCR Primers for Detection of Phytotoxin-Producing Strains

Jae Sung Jung¹, Hyo Shim Han¹ and Young Jin Koh*

Department of Applied Biology and ¹Biology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea
(Received on November 22, 2001)

Many pathovars of the species *Pseudomonas syringae* are known to produce different phytotoxins as secondary metabolites. Although phytotoxins generally enhance the virulence of *P. syringae*, they are not required for pathogenesis. Among the phytotoxins produced by *P. syringae*, lipodepsipeptides, coronatine, phaseolotoxin, and tabtoxin are the most well-known toxins which have been intensively studied for their structure, mode of action, biosynthesis, and regulation. A polymerase chain reaction (PCR) technique that amplifies a segment of the phytotoxin gene cluster using a primer set has been developed in recent years. This method offers the advantages of speed and sensitivity compared to the approaches based on physiological and biochemical methods. PCR detection of genes involved in the production of toxins could be exploited for early diagnosis of plant diseases caused by *P. syringae* pathovars.

Keywords : coronatine, lipodepsipeptides, PCR primer, phaseolotoxin, phytotoxin, *Pseudomonas syringae*, tabtoxin

머리말

“식물독소(phytotoxin)”라는 용어의 정의에 대하여 오랫동안 논란이 있어 왔으나 일반적으로 고분자 화합물과 식물 성장촉진 물질을 제외하고 식물에 독성을 나타내는 물질을 총칭하여 식물독소라 일컫는다. 고분자 화합물을 제외하는 이유는 고분자 화합물이 식물체에 미치는 영향이 화학적이라기보다 물리적인 경우가 많기 때문이다. 또한, gibberellic acid와 같은 식물 성장촉진 물질은 비록 병원균인 *Gibberella fujikuroi*에 의해 생성되는 독소로 처음 인식되었으나 “식물생장조절물질(plant growth regulator)” 영역으로 분류될 수도 있기 때문에 독소에서 제외시키고 있다. 식물체에 병을 일으키는 식물병원 세균 중에서 일부 종이 독소를 생성하는 것으로 알려졌다(Durbin, 1982). 독

소의 종류에 따라서 작용하는 세포 내 부위와 작용 기작이 다르며, 독소를 처리한 식물체에서 나타나는 증상도 황화(chlorosis), 괴사(necrosis), 수침(watersoaking), 시들음(wilting), 기형생장(growth abnormalities) 또는 이러한 증상들이 조합된 복합증상 등 다양하게 나타난다.

*Pseudomonas syringae*는 병원성을 나타내는 식물에 따라 57종류의 병원형(pathovar)으로 나뉘어진다(Gardan 등, 1997). *P. syringae*는 2차대사산물로 다양한 종류의 식물독소를 생성하여 기주 식물체에 황화현상을 일으키거나 괴사시킨다. *P. syringae*의 병원형 중에서 *P. syringae* pv. *syringae*를 제외한 대부분의 병원형들은 기주 범위가 좁지만 *P. syringae*에 의해 생성되는 식물독소들은 기주 특이성이 없어 기주가 아닌 식물체에도 기주에서 일어난 것과 유사한 증상을 일으킨다. 일반적으로 *P. syringae*가 병원성을 나타내는데 식물독소의 생성이 필수적인 것은 아니지만, 식물독소의 생성이 병원성을 보다 강하게 발현시키는 데 기여하는 것으로 알려졌다(Bender 등, 1999). 즉, 경우에 따라 독소를 생성하지 않는 균주에 의해서도 병

*Corresponding author

Phone) +82-61-750-3865, Fax) +82-61-750-3208

E-mail)youngjin@sunchon.ac.kr

Table 1. Phytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pathovars

Phytotoxins	<i>P. syringae</i> pathovars	References
Lipodepsinonapeptide (syringomycin, syringotoxin, syringostatin, pseudomycin)	<i>pv. syringae</i> <i>pv. apata</i> <i>pv. atrofaciens</i>	Bachmann <i>et al.</i> (1997) Gross and DeVay (1977) Vassilev <i>et al.</i> (1996)
Syringopeptin	<i>pv. syringae</i>	Ballio <i>et al.</i> (1991)
Coronatine	<i>pv. atropurpurea</i> <i>pv. actinidiae</i> <i>pv. glycinea</i> <i>pv. maculicola</i> <i>pv. morsprunorum</i> <i>pv. tomato</i>	Nishiyama <i>et al.</i> (1976) Jung <i>et al.</i> (unpublished data) Mitchell and Young (1978) Wiebe and Campbell (1993) Liang <i>et al.</i> (1994) Bender <i>et al.</i> (1987)
Phaseolotoxin	<i>pv. actinidiae</i> <i>pv. phaseolicola</i>	Tamura <i>et al.</i> (1989) Mitchell (1976)
Tabtoxin	<i>pv. tabaci</i> <i>pv. coronafaciens</i> <i>pv. garcae</i>	Stewart (1971) Sinden and Durbin (1970) Lydon and Patterson (2001)

이 발생하지만 독소를 생성하는 *P. syringae*가 식물체에 더 강한 병원성을 나타낸다(Bender 등, 1987). 이렇게 독소 생성 능력이 다른 두 종류의 균주가 동시에 같은 포장에서 발견되고 있으나(Ullrich 등, 1993), 독소를 생성하는 균주가 훨씬 많은 빈도로 분리되고 있다(Liang 등, 1994). *P. syringae*의 여러 병원형에서 생성되는 다양한 화학구조를 가진 독소들은 대부분 작용범위가 다른 항균활성을 갖는데 이러한 특성은 *P. syringae*가 다양한 서식지에서 다른 미생물들과 경쟁하는데 유리하게 작용하게 한다. *P. syringae*가 다른 세균에 비해 기주 범위가 넓은 것도 광범위한 항미생물 활성을 갖는 독소를 생성하기 때문이다(Völksch와 Weingart, 1998). 독소 생합성에 관련된 유전자들은 염색체상에 cluster를 형성하여 존재하는 것이 보통이지만 coronatine의 경우처럼 유전자가 plasmid에 존재하기도 한다(Bender 등, 1991).

*P. syringae*는 각 병원형에 따라 기주 범위가 정해져 있고, 각 병원형에 의해 생성되는 독소가 알려져 있으므로 (Table 1), 독소의 생합성에 관련된 유전자의 존재 유무를 검출함으로써 병원성 세균의 유무를 간접적으로 확인할 수 있다. 다행히 독소 유전자들이 *P. syringae*의 여러 병원형 사이에서 잘 보존되어 있어 PCR을 통해 이 부분을 증폭함으로써 독소생산 세균을 특이적으로 검출할 수 있다(Audy 등, 1996; Bereswill 등, 1994; Sorensen 등, 1998). 따라서, 지금까지 *P. syringae*의 병원형을 동정하는데 사용되어온 생리학적, 생화학적 및 병리학적인 방법들은 시간이 많이 소요되는 단점이 있으므로, PCR을 이용하여 독소생산에 관련된 유전자를 검출하여 신속하게 병원형을 동정하는 방법들이 개발되고 있다(Bultreys와 Gheysen,

1999). 이 방법들은 특히 동일한 작물에 비슷한 병징을 일으키는 서로 다른 병원성 세균의 감염 여부를 확인하려 할 경우 유용하게 쓰일 수 있다.

이 총설에서는 *P. syringae*에서 생산되는 대표적인 식물 독소인 lipodepsipeptides, coronatine, phaseolotoxin 및 tabtoxin에 대해 그 특성과 생합성에 관련된 유전자의 구조를 살펴보고 PCR을 통해 각 독소 유전자의 존재를 쉽게 확인할 수 있도록 개발된 PCR primer 및 활용가능성에 대하여 고찰하였다.

본 문

Lipodepsipeptide. Lipodepsipeptide는 *P. syringae* *pv. syringae*에서 합성되어 식물체에 독성을 나타내는 구조적으로 유사한 화합물들을 일컫는다. Lipodepsipeptide는 아홉 개의 아미노산 잔기가 β -hydroxy fatty acid와 결합되어 있고 분자량이 약 1,200 Da 가량인 lipodepsinonapeptide와 22개 또는 25개의 아미노산 잔기를 가지고 있어 보다 복잡한 구조를 갖는 분자량이 약 2,500 Da에 달하는 syringopeptin으로 크게 나뉘어 진다. Lipodepsinonapeptide는 다시 약간의 구조적 변형에 따라 syringomycin, syringotoxin, syringostatin, pseudomycin 등으로 분류된다(Bachmann 등, 1997). Lipodepsinonapeptide와 syringopeptin 두 종류의 독소 모두 식물 뿐 아니라 다른 생물에게도 독성을 나타내는데, 작용 기작은 세포막에 구멍을 형성하여 이온의 유동을 증가시킴으로써 세포를 괴사시킨다(Hutchison 등, 1997). 그 중에서 syringopeptin이 식물체에 더 강한 독성을 나타내는 것으로 알려졌다(Icobellis 등, 1992). 최근

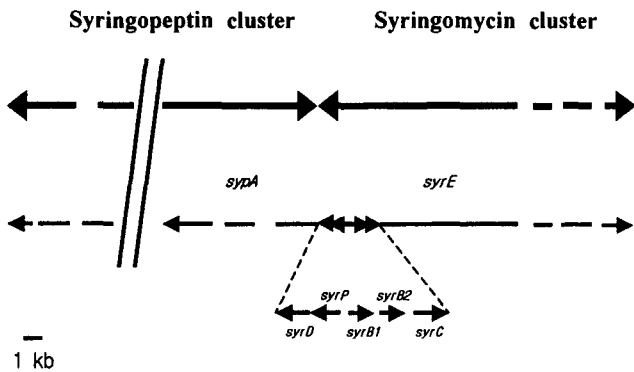


Fig. 1. A genetic map of the syringomycin and syringopeptine gene cluster showing positions and orientations of *syrD*, *syrP*, *syrB1*, *syrB2*, *syrC*, *syrE*, and *syrA* on the chromosome of *P. syringae* pv. *syringae*.

이 독소가 *P. syringae* pv. *syringae*뿐만 아니라 *P. syringae* pv. *atrofaciens*(Vassilev 등, 1996)와 *P. fuscovaginae*(Flamand 등, 1996)에 의해서도 생성된다고 보고되었다.

Lipodepsinonapeptide의 생합성에 관여하는 유전자들은 염색체내에 존재하며 약 35 kb 정도의 부위에 여섯 개의 ORF가 모여 cluster를 형성하고 있다(Fig. 1). 이 중 *syrB1*, *syrB2*, *syrC*, *syrE* 유전자 산물은 syringomycin의 합성에 관여한다. *syrB* 유전자 산물은 syringomycin에 있는 9개의 아미노산 중 하나를 활성화시키는 한편 *syrC*의 산물은 thioesterase와 acyltransferase 활성을 갖는다(Guenzi 등, 1998; Zhang 등, 1995). 특히 *syrE*는 28.4 kb의 커다란 ORF를 가지고 있어 1,039 kDa의 거대한 synthetase 단백질을 암호화한다. 이 단백질에는 *syrE1*부터 *syrE8*까지 8군데의 아미노산 활성화 module이 있다(Guenzi 등, 1998). 각 module에는 elongation, adenylation, thiolation 도메인이 있으며 각 module 사이에 45-90%의 상동성을 보이고 있다. Syringomycin의 합성은 먼저 E1의 adenylation 도메인이 L-serine을 인식하면서 시작된다. Adenylation된 serine은 carboxyl thioester를 형성하여 synthetase에 결합한다. 활성화된 serine은 thiolation 도메인으로 전달된다(Guenzi 등, 1998). 다음 단계로는 *SyrC* 단백질이 3-hydroxydodecanoyl-CoA를 가수분해시켜 3-hydroxy fatty acid를 E1에 있는 L-serine으로 전달시킴으로써 3-hydroxydodecanoyl-L-serine을 형성한다. 이 화합물은 두 번째 아미노산이 thiolation 도메인에 결합되어 있는 E2로 옮겨진다(Stachelhaus와 Marahiel, 1995). 이와 같은 과정이 순차적으로 E8까지 진행된다. 아홉 번째 adenylation 도메인은 *syrB* 유전자에 의해 암호화된다. *syrB1*은 adenylation과 thiolation 도메인을 가지고 있으며 L-threonine을 활성

화시켜 *syrE* synthetase로 전달한다(Guenzi 등, 1998). *syrB2*의 기능에 대해서는 잘 알려지지 않았으나 thiolation 도메인에 결합되어 있는 L-threonine을 4-chlorothreonine으로 변형시키거나 아홉 개의 아미노산이 peptide를 형성한 뒤 cyclization되어 lactone ring이 형성될 때 관여하는 것으로 추측하고 있다.

*syrD*는 *syrB*, *syrC*와 반대방향으로 전사되며 막단백질을 암호화하여 syringomycin의 분비에 관여한다(Quigley 등, 1993). *syrD*는 ATP-binding cassette(ABC) transporter에 속하는 단백질로 ATP가 결합하는 C 말단의 친수성 부위는 세포질 쪽을 향하고 반면에 소수성인 N 말단부위는 막에 위치해 있다. 결과적으로 *syrD*는 ATP를 이용하여 syringomycin을 세포밖으로 내보내는 역할을 담당한다. *P. syringae* pv. *syringae*가 자신이 생성한 lipodepsipeptide 독소에 저항성을 나타내는 것은 이와 같은 ABC transporter 단백질에 의해 독소가 세포 밖으로 효율적으로 배출되기 때문이다(Quigley 등, 1993).

*syrP*는 *syrB*와 *syrD* 사이에 존재하며 syringomycin의 생합성을 조절한다. 1,059 bp인 이 유전자의 염기서열을 살펴본 결과 대장균의 조절단백질인 CheA와 유사하여 histidine kinase로 생각되었다. 특히 CheA 단백질에서 phosphotransfer 및 acceptor 도메인이 있는 N 말단과 상동성이 있는 사실로 미루어 *syrP* 유전자 산물이 syringomycin 생합성을 조절하는 phosphorylation cascade에 관여하는 조절 단백질일 것으로 생각된다(Zhang 등, 1997). Syringopeptin 생합성 유전자 *syp* gene cluster는 syringomycin 생합성 유전자 *syr* gene cluster 바로 옆에 존재하는데 *syrD*의 아래쪽에 syringopeptin synthetase 유전자 *syrA*가 있다. Syringopeptin은 syringomycin에 비해 구성 아미노산 수가 많기 때문에 gene cluster도 커서 그 크기가 60 kb에 이를 것으로 추정하고 있다(Gross 등, 1998). Syringomycin이 합성되는 조건에서 syringopeptin도 합성되는 사실은 두 독소가 공통된 조절기구에 의해 생성됨을 시사해 준다(Grgurina 등, 1996).

P. syringae pv. *syrigae*는 syringopeptin과 syringomycin 등 두 종류의 독소를 모두 생성하는 것으로 알려졌고 syringomycin gene cluster 중에서 *syrB*와 *syrD*의 염기서열이 잘 보존되어 있으므로(Quigley와 Gross, 1994), 이 유전자중에서 특이적인 primer를 선발하여 PCR을 수행함으로써 독소생산 *P. syringae* pv. *syrigae* 균주를 검출할 수 있다. 특히 *syrD*는 lipodepsipeptide를 생산하는 모든 균주에서 보존되어있기 때문에(Grgurina 등, 1996) PCR을 통해 독소를 생산하는 *P. syringae* pv. *syrigae* 균주를 검출할 때 이 유전자가 이용되고 있다. *syrB* 유전자로부

Table 2. PCR primers for the detection of phytotoxins producing bacterial strains

Phytotoxins	Primer names	Nucleotide sequences (5'→3')	Target genes	Product sizes (bp)	References
Lipodepsinonapeptide	B1	CTTTCCGTGGTCTTGATGAGG	<i>syrB</i>	752	Sorensen <i>et al.</i> (1998)
	B2	TCGATTTTGCCCGTGATGAGTC			
	D1	AAACCAAGCAAGAGAAGAAGG	<i>syrD</i>	446	Sorensen <i>et al.</i> (1998)
	D2	GGCAATACCGAACAGGAACAC			
Lipodepsipeptide (syringomycin, syringopeptin)	syD1	CAGCGGCGTTGCGTCCATTGC	<i>syrD</i>	1,040	Bultreys and Gheysen (1999)
	syD2	TGCCGCGACGATGTAGACCAGC			
Coronatine	CFL1	GGCGCTCCCTCGCACTT	<i>cfl</i>	652	Bereswill <i>et al.</i> (1994)
	CFL2	GGTATTGGCGGGGTGC	<i>corR</i>	815	Jung <i>et al.</i> (unpublished)
	CorR1	ATTCGACATGCATCGTTTT			
	CorR2	GCTGAAGGTCAGGATCAAGC	<i>cmaTU</i>	1,039	Jung <i>et al.</i> (unpublished)
	CMA1	CTTTCGTCCTTAGACGCTTG			
	CMA2	CTGAGTTGCGGACAAAATA			
Phaseolotoxin	HM6	CGTGTCTCTGGGATAAAAGC	<i>phtE</i>	1,900	Prosen <i>et al.</i> (1993)
	HM13	GTTGAATTTCACTACCCG	<i>phtE</i>	1,400	Audy <i>et al.</i> (1996)
	HB14F	CAACTCCGACACCAGCGACCGAGC			
	HB14R	CCGGTCTGCTCGACATCGTGCCAC	<i>argK</i>	1,098	Sawada <i>et al.</i> (1997)
	OCTF	TATTACCCTGATGAGCTCGA			
	OCTR	GATGATCGACCTTGTTGACCTCCCG			
Tabtoxin	tblA1	CTGGTCACTGCGCTAGGC	<i>tblA</i>	829	Lydon and Patterson (2001)
	tblA2	CGTGATTGACTCAGGGCACTAG	<i>tabA</i>	1,020	Lydon and Patterson (2001)
	tabA1	GTGCCAATATCCGAAAGCTT			
	tabA2	ACTTGTCAAAGTTCTCGCAC			

터 설계된 primer인 B1/B2는 Southern blot 분석에서 양성인 *P. syringae* pv. *syriae* 균주 모두에서 예상되었던 752 bp의 DNA 절편이 검출되어 특이성이 높았으나 *syrD* 유전자에서 설계된 primer인 D1/D2에 의해서는 기대되었던 446 bp 외에 비특이적인 band가 증폭된 바 있다 (Sorensen 등, 1998). 그러나 *syrD* 유전자의 염기서열 중 다른 부분에서 설계된 syD1/syD2 primer는 syringomycin 과 syringopeptin 생산 균주인 *P. syringae* pv. *syriae*와 *P. syringae* pv. *atropurpurea*, *P. syringae* pv. *aptata*에서 특이적으로 1,040 bp의 DNA 절편을 증폭시켰다(Table 2). 한편 syringotoxin을 생산하는 것으로 알려진 *P. fuscovaginae*에서는 특이적인 DNA 절편의 증폭이 일어나지 않아 이 종에서의 독소분비는 다른 종류의 유전자 산물에 의하는 것으로 추정되고 있다(Bultreys와 Gheysen, 1999).

Coronatine. Coronatine은 coronafacic acid(CFA)와 coronamic acid(CMA)의 두 성분이 amide 결합으로 연결되어 있는 화합물로 *P. syringae* pv. *atropurpurea*, *P. syringae* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *morsprunorum* 등에 의해 생성되는 식물독소이다 (Bender 등, 1999). 일본에서 처음 동정 보고된 참다래 껍질병의 병원 세균인 *P. syringae* pv. *actinidiae*의 pathotype

strain Kw11를 비롯하여 일본에서 수집된 균주들의 경우 모두 식물독소로 phaseolotoxin을 생성하는 것으로 보고된 바 있다(Tamura 등, 1989). 그러나, 국내에서 재배되고 있는 참다래에서 분리된 참다래 껍질병균 균주들은 모두 일본에서 수집된 균주들과는 달리 phaseolotoxin 대신 coronatine을 생산하는 것으로 밝혀졌다(Jung 등, unpublished data).

Coronatine은 기주 특이성을 보이지 않으며 식물체에 황화현상, 이상비대, 조직의 발육장애 등을 일으킨다. Coronatine의 작용 기작은 명확하지 않으나 methyl jasmonate와 유사한 생화학적 활성을 갖고 있을 것으로 생각하고 있다. Arabidopsis에서 coronatine에 민감하지 않은 돌연변이체는 methyl jasmonate에 대해서도 반응하지 않았다(Benedetti 등, 1998). Methyl jasmonate는 상처가 났거나 병원균의 침입 등에 의해 식물체가 스트레스를 받았을 때 합성되는 신호전달 물질로 알려졌다. 이 물질은 proteinase inhibitors, lipoygenases, ribosome-inactivating proteins 등과 같은 단백질의 합성을 촉진시키는 한편 광합성에 관련된 유전자의 발현을 억제시킨다(Koda, 1992). 그러나, coronatine이 구체적으로 어떻게 methyl jasmonate처럼 행동하여 식물에 독성을 나타내는지에 대해서는 아직까지

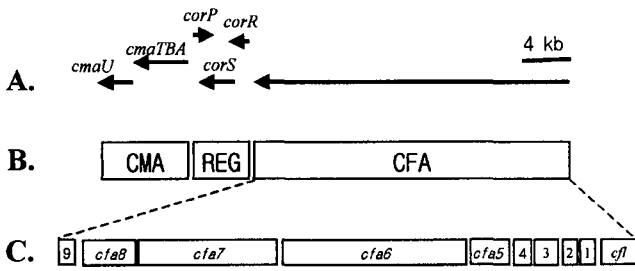


Fig. 2. Functional and physical map of the coronatine gene cluster. (A) The horizontal lines with arrowheads indicate the location and extent of the respective gene. (B) Functional region regions of the coronatine gene cluster: CMA, coronamic acid biosynthetic gene cluster; REG, regulatory region; CFA, coronafacic acid biosynthetic gene cluster. (C) Expanded view of CFA gene cluster. This figure was modified from reference of Bender *et al.* (1999).

정확하게 알려지지 않았다.

Coronatine 생합성에 관련된 유전자 cluster는 *P. syringae* pv. *tomato*와 *P. syringae* pv. *maculicola*에서 드물게 염색체 안에 위치하고 있었지만(Moore 등, 1989; Cuppels와 Ainsworth, 1995), 그 밖의 경우에는 커다란 크기의 plasmid 내 약 30 kb 부위에서 발견되고 있다(Bender 등, 1989; Young 등, 1992; Ullrich와 Bender, 1994). 이 유전자 cluster는 polyketide 성분인 coronafacic acid의 생합성에 관여하는 유전자들이 모여 있는 CFA 부위와, cyclic amino acid인 coronamic acid의 생합성 유전자들이 있는 CMA 부위, 그리고 coronatine 합성의 조절에 관여하는 유전자들이 있는 REG의 세 부분으로 크게 나뉘어진다(Fig. 2).

방사성 동위원소로 표지된 전구물질을 이용하여 CFA의 생합성은 각각 한 분자의 pyruvate와 butyrate, 세 분자의 acetate 잔기로부터 일어나는 것으로 밝혀졌다(Parry 등, 1994). CFA의 생합성에 관여하는 유전자들은 19 kb에 달하는 하나의 커다란 transcript로 전사되는데 여기에는 10 개의 ORF가 존재하고 있다(Rangaswamy 등, 1998). 현재 각 ORF에 의해 만들어지는 단백질의 역할에 대한 연구가 진행되고 있다. 염기서열 분석을 통해 5' 쪽의 *cfa1*, *cfa2*, *cfa3*의 산물이 acyl carrier 단백질, fatty acid desaturase, β -ketoacyl synthetase와 각각 관련이 있는 것으로 알려졌다(Penfold, 등, 1996). 한편 database 분석결과 *cfa4*에 대해서는 관련이 있는 유전자를 발견할 수 없었으나 *cfa5*의 산물은 acetyl-coenzyme A ligase와 연관성이 있는 것으로 나타났다(Penfold, 등, 1996). *cfa6*과 *cfa7* 유전자의 기능에 대해서는 알려져 있지 않으나 200 kDa 이상의 단백질을 암호화 할 것으로 예상하고 있다. 또 돌연변이를 이용한 연구를 통해, *cfa8*은 coronatine 생합성에 필수적인 유전자이나 *cfa9*는 coronatine 생합성에 필수적이지는

않은 것으로 밝혀졌으며, *tnpI*은 coronatine 합성과 무관한 것으로 알려졌다. 이들 세 유전자의 산물은 각각 oxidoreductases, thioesterases 및 transposases와 관련이 있는 것으로 나타났다(Rangaswamy 등, 1998). 그 밖에 5' 쪽에 위치한 2.37 kb 크기의 *cfl* 유전자에 대해서 비교적 잘 알려져 있는데, 이 유전자의 산물은 coronafacate ligase로 CFA와 CMA 사이에 amide 결합을 형성시킨다(Bereswill 등, 1994; Liyanage 등, 1995).

Coronamic acid는 isoleucine으로부터 만들어지는 ethylcyclopropyl amino acid로 coronatine gene cluster 중 6.9 kb에 달하는 CMA부위에 의해 암호화된다. 이 부위에는 *cmaA*, *cmaT*, *cmaU*의 세 개의 ORF가 존재하여 이들 유전자의 산물에 의해 coronatine의 생합성이 이루어진다(Fig. 2). *cmaA*는 2.7 kb의 ORF로 염기서열을 바탕으로 추정해 볼 때 nonribosomal peptide synthetase와 같은 아미노산 활성화 효소일 것으로 믿어지며, ORF가 1.2 kb인 *cmaT*는 thioesterase로 생각된다. 그러나 0.9 kb인 *cmaU*는 지금까지 알려진 어떤 염기서열과도 유사성이 없었다(Ullrich와 Bender, 1994).

Coronatine 생합성의 조절에 관여하는 REG부위는 *corP*, *corS*, *corR*의 세 유전자로 구성되어 있다(Ullrich 등, 1995; Peñaloza-Vázquez와 Bender, 1998). Coronatine의 생합성은 온도에 의해 전사 수준에서 조절되는데 18°C에서 최고의 합성을 보이나 온도가 증가함에 따라 감소하다가 28°C에서는 생산이 완전히 중단된다(Ullrich 등, 1995; Budde 등, 1998). 이 유전자들이 온도에 따른 coronatine 생합성의 조절에 관여하고 있다. 이들 중에서 DNA-binding domain을 가지고 있는 *corR* 유전자의 산물이 CFA 유전자 cluster의 위쪽부위에 결합하여 coronatine 생합성 과정의 positive activator로 작용하며(Peñaloza-Vázquez와 Bender, 1998), *corS*는 histidine protein kinase와 염기서열에서 연관성을 보이고 있고, 다른 sensor kinase들에서 발견되는 다섯 개의 sensor motif 중 네 개를 가지고 있는 것으로 보아 이 유전자의 산물은 sensor 단백질일 것으로 생각된다. *corP*의 역할에 대해서는 잘 알려지지 않았으나 *corR*과 함께 regulator 단백질의 역할을 담당 할 것으로 생각되고 있다(Ullrich 등, 1997).

PCR을 통해 coronatine 생산 균주를 검출하기 위한 primer로는 CFA 부위에 위치한 *cfl* 유전자에서 설계된 primer 1/primer 2 set가 coronatine 생산 균주에서 650 bp의 DNA 절편을 특이적으로 증폭시키는 것으로 보고된 바 있으며(Bereswill 등, 1994), 최근 저자 등이 CMA와 REG 부위에서 설계한 primer인 CMA1/CMA2와 CorR1/CorR2도 coronatine 생산 균주에서 각각 1,039와 815 bp의 특이적

인 PCR 산물을 증폭시켰다(Jung 등, submitted). PCR을 통해 coronatine 생산 균주를 검출하기 위해 개발된 각 primer들의 염기서열은 Table 2에 나타내었다.

Phaseolotoxin. 콩과식물에 halo blight를 일으키는 병원균인 *P. syringae* pv. *phaseolicola*와 참다래 궤양병균인 *P. syringae* pv. *actinidiae*에 의해 생성되는 독소인 phaseolotoxin은 sulfodiaminophosphinyl 잔기에 ornithine, alanine, homoarginine의 tripeptide가 결합되어 있는 구조를 하고 있다. 이 독소는 요소 회로에서 ornithine과 carbamoyl phosphate를 citrulline으로 만드는 효소인 ornithine carbamoyl transferase(OCTase)의 작용을 억제시켜 독성을 나타낸다(Moore 등, 1984). OCTase의 억제는 ornithine을 축적시키고 세포 내 arginine pool을 고갈시켜 궁극적으로 황화현상을 일으키게 된다. 요소회로는 원핵생물과 진핵생물 모두에게 중요한 대사경로이므로 이 독소는 식물 뿐 아니라 *Escherichia coli*를 비롯한 다른 세균에도 활성을 나타낸다. 그러므로 phaseolotoxin을 생산하는 *P. syringae*들은 자기가 생산한 독소로부터 자신을 보호하기 위해 OCTase 외에 phaseolotoxin에 저항성을 갖는 효소인 ROCTase도 함께 가지고 있으므로 이 균주는 두 종류의 isozyme을 갖고 있는 셈이 된다(Mosqueda 등, 1990).

Phaseolotoxin의 생합성에 관련된 유전자들에 관한 연구는 독소를 생산하지 못하는 돌연변이를 이용하여 complementation 분석을 함으로써 28 kb 부분에 관련 유전자들이 모여 있음이 밝혀졌다(Zhang 등, 1993). 독소생성에 관련된 유전자는 여덟 개의 transcription units로 cluster되어 있으며 *phtA*부터 *phtH*까지 순서대로 명명되었다. 흥미로운 사실은 이 유전자 cluster 바로 옆에 phaseolotoxin에 저항성을 갖고있는 OCTase인 ROCTase의 유전자 *argK*가 인접해 있다는 사실이다(Mosqueda 등, 1990)(Fig. 3). 그러나 *argK*의 염기서열은 phaseolotoxin에 민감한 OCTase

유전자인 *argF*와 비교하여 상동성이 낮을 뿐 아니라 G+C 함량도 *P. syringae* pv. *phaseolicola* genome에서의 함량과 다른 점에 비추어 *argK* 유전자가 *argF*에서 유래된 것이 아니라 진화과정에서 다른 세균으로부터 전달되어 온 것으로 생각되고 있다(Hatziloukas와 Panopoulos, 1992).

여덟 개의 transcription units 중에서 *phtE*의 염기서열이 먼저 밝혀졌다(Zhang과 Patil, 1997). 6.4 kb에 달하는 하나의 transcript로 전사되는 이 operon에는 여섯 개의 ORF가 있다. 이 중 세 ORF의 염기서열이 지금까지 발표된 염기서열과 상동성이 있었다. 그 중 ORF3은 대장균의 acetylornithine aminotransferase와 다른 생물의 ornithine aminotransferase와 상동성이 있는 점으로 미루어 phaseolotoxin의 구성성분인 ornithine의 생합성에 관여할 것으로 생각되고, ORF5는 C 말단에 helix-turn-helix motif를, N 말단에 leucine zipper domain을 갖고 있는 AraC family의 transcriptional factor와 비슷한 특징을 보이고 있어, phaseolotoxin 생합성의 조절자 역할을 할 것으로 추정된다. Phaseolotoxin에는 ornithine, alanine 및 homoarginine의 tripeptide 성분을 포함하고 있으므로 이 부분의 합성에는 coronatine 생합성 과정과 유사한 nonribosomal, thiotemplate mechanism에 의할 것으로 보인다. 즉, adenylation과 thiolation 도메인을 가지고 있는 peptide synthetase에 의해 합성이 일어난다. 한편 ORF6는 다른 여러 생물의 fatty acid desaturase 유전자와 상동성이 있는 것으로 나타났다. 이 유전자 산물은 세포막의 인지질 성분 중 불포화 지방산 부분의 생산에 관여한다. Phaseolotoxin이 18°C 정도의 비교적 낮은 온도에서 생산되므로 이 효소는 낮은 온도에서 phaseolotoxin의 분비를 쉽게 하기 위한 막성분의 변화에 영향을 미칠 것으로 생각된다(Hatziloukas 등, 1995). 나머지 ORF들의 염기서열을 지금까지 발표된 것들과 비교할 때 상동성이 있는 염기서열을 찾을 수 없었다.

Phaseolotoxin 생합성 유전자를 검출하기 위한 PCR primer로는 유전자 cluster에서 1.9 kb의 DNA를 증폭시키는 HM6/HM13 primer가 처음 설계되었다(Prosen 등, 1993). 그 후 이 DNA 절편의 염기서열로부터 *P. syringae* pv. *phaseolicola*의 DNA에서 1.4 kb의 절편을 선택적으로, 그리고 보다 효율적으로 증폭시키는 primer HB14F/HB14R이 보고되었다(Audy 등, 1996). 한편, 앞서 언급한 바와 같이 phaseolotoxin을 생산하는 세균은 독소로부터 자신을 방어하기 위해 ROCTase를 생산하므로 이 유전자의 존재를 확인함으로써 phaseolotoxin 생산 균주를 간접적으로 검출할 수 있다. 이를 위해 *argK*의 염기서열에서(Mosqueda 등, 1990) 설계된 OCTF/OCTR primer set가 phaseolotoxin 생산 균주인 *P. syringae* pv. *phaseolicola*와 *P. syringae* pv.

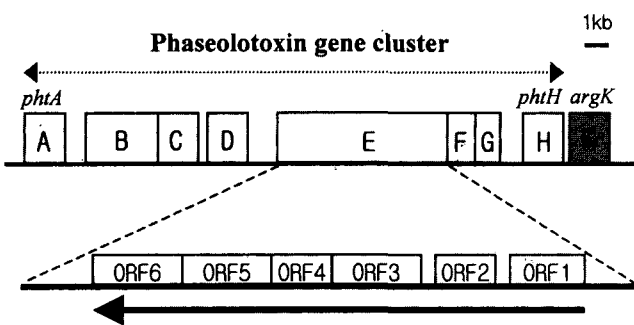


Fig. 3. Physical map of phaseolotoxin gene cluster and open reading frames in the *phtE* locus. Upper rectangular boxes indicate eight transcriptional loci of phaseolotoxin gene cluster and phaseolotoxin resistant gene, *argK*.

actinidia에서 1,098 bp의 DNA를 선택적으로 증폭시킨 바 있다(Sawada 등, 1997)(Table 2).

Tabtoxin. Tabtoxin은 tabtoxinine- β -lactam(T β L)에 threonine이 펩티드 결합으로 연결된 dipeptide이다. 세균에 의해 만들어진 tabtoxin은 그 자체로는 생물학적 활성을 가지고 있지 않으나 식물이나 다른 세균의 aminopeptidase에 의해 펩티드 결합이 가수분해될 때 유리되는 T β L이 독성을 나타내게 된다(Uchytıl과 Durbin, 1980). 이 독소를 생산하는 세균은 *P. syringae* 중에서 *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. syringae* pv. *coronafaciens*, *P. syringae* pv. *garcae* 등으로 알려졌다(Mitchell, 1991). T β L의 독성은 이 화합물이 glutamine synthetase의 작용을 억제함으로써 일어나는데(Tomas와 Durbin, 1985), 그 결과 glutamine이 생성되지 않게 된다. 뿐만 아니라 glutamine 생성 과정에서 일어나는 암모니아에 대한 독성 제거 기능이 상실되어 축적된 암모니아에 의해 엽록체의 틸라코이드막이 파괴된다(Turner와 Debbage, 1982). 이 독소에 저항성을 나타내게 되는 기작은 glutamine synthetase를 adenylation시켜 T β L의 억제를 받지 않게 하거나(Knight 등, 1986), 특별한 β -lactamase를 생산하여 독소 성분을 분해시키는 것으로 알려졌다(Knight 등, 1987).

Tabtoxin의 생합성 경로에 대하여 아직까지 완전히 알려지지는 않았지만, T β L의 생합성과 저항성에 관련된 유전자들이 *P. syringae* BR2 염색체에 32 kb 정도로 cluster되어 있음이 확인된 바 있다(Kinscherf 등, 1991). 이 중에서 약 3 kb 정도 크기의 T β L 생성에 필수적인 두 유전자 *tabA*와 *tblA*의 염기서열이 밝혀졌다. *tabA* 유전자 산물은 다른 세균의 *lysA* 유전자 산물과 아미노산 서열에서 상동성이 있었으나(Engst와 Shaw, 1992), *tblA*의 산물은 지금까지 알려진 어떤 아미노산 서열과도 상동성을 보이지 않았다(Barta, 1993). 한편 *tblA*의 전사를 양성적으로 조절하여 tabtoxin 합성을 조절하는 유전자인 *lemA*의 염기서열이 밝혀진 바 있다(Barta 등, 1992). 그밖에 *P. syringae* pv. *tabaci*에서 lysine 생합성 과정의 전구체인 diaminopimelic acid와 T β L의 생합성에 공통적으로 필요한 효소인 L-2,3-dihydrodipicolinate reductase 유전자 *dapB*의 염기서열이 알려진 바 있다(Liu와 Shaw, 1997).

Tabtoxin을 생산하는 균주를 검출하기 위한 PCR primer로 *tabA* 유전자의 위쪽에 위치하고 있는 *tblA* 유전자를 포함하는 primer *tblA1/tblA2*가 설계되었다. 이 primer set의 5' 끝은 각각 *tblA* ORF2의 시작부위에서 61 bp 위쪽에, *tabA* 유전자의 시작부위로부터 24 bp 위쪽에 위치하고 있어, 829 bp의 DNA 절편을 증폭시킨다(Lydon과 Patterson, 2001). 다른 primer set *tabA1/tabA2*는 *tabA* 유전자를 포함하도록 설계되었는데 각 primer의 5'은 *tabA*

유전자의 시작 부위와 1,000 bp 아래의 염기로부터 각각 시작된다(Engst와 Shaw, 1992). 이 primer set는 tabtoxin 생산 균주로부터 1,020 bp의 DNA 절편을 증폭시킨다(Lydon과 Patterson, 2001)(Table 2).

맺는말

*P. syringae*에 의해 생성되는 식물독소에는 lipodepsipeptides, coronatine, phaseolotoxin, tabtoxin 등 지금까지 살펴 본 네 종류 외에 *P. syringae* pv. *persica*에 의해 생산되는 perisicamycin(Bazic과 Guittet, 1996)과 *P. syringae* pv. *tagetis*에 의해 생산되는 tagetitoxin(Rhodehamel과 Durbin, 1989)이 알려졌다.

이렇게 *P. syringae*의 여러 병원형에서 생성되는 독소를 확인하기 위한 1차적인 방법은 PCR을 통하여 독소 생합성 관련 유전자의 존재여부를 확인하는 것이다. 그러나 독소 생합성 관련 유전자 존재여부만으로 독소의 생산을 증명할 수 없으므로 정확하게 독소 생성 여부를 확인하기 위해서는 bioassay 과정이 필요하다. 식물독소들이 항미생물 활성을 갖는 특성을 이용하여 식물독소를 검출하는 방법이 알려졌다. 예를 들면 phaseolotoxin은 *E. coli* K-12의 성장을 억제시키므로 고체배지에서 halo zone의 생성 여부로 확인할 수 있고(Staskawicz와 Panopoulos, 1979), syringomycin 생성은 *Geotrichum candidum*과 *Rhodotorula pilimanae*의 성장을 억제시키는 것으로 알 수 있다(Bultreys와 Gheysen, 1999). Tabtoxin도 민감한 세균이나 곰팡이를 이용하여 확인할 수 있으나(Gasson, 1980), coronatine의 경우는 항미생물 활성이 없기 때문에 토마토 잎 등 다양한 식물체를 이용하여 검정한다(Cuppels과 Ainsworth, 1995).

식물독소들은 낮은 농도에서도 식물병의 특징적 증상을 나타낸다. 식물병에 미치는 식물독소의 역할은 독소를 생산하는 균주의 병원성을 증가시키는데 기여하지만 병의 발생에 직접적으로 작용하지는 않는다. 실제로 돌연변이에 의해 syringomycin을 생산하지 않는 *P. syringae* pv. *syringae*는 야생형과 비교해 독성의 35%만이 감소하는 것으로 보고되었다 (Grgurina 등, 1996).

최근 식물독소의 생합성 과정에 관한 연구와 생합성 관련 유전자의 클로닝에 관하여 많은 연구가 진행되고 있다. 그 이유 중 하나는 새로운 생물학적 활성이 있는 화합물을 만드는 것이 가능하기 때문이다. 즉, coronatine이나 syringomycin의 생합성 관련 유전자 염기서열이 밝혀지면 이를 이용하여 기존의 화합물을 변형시켜 다양한 생물학적 활성을 갖는 새로운 항생물질의 개발이 가능해지

기 때문이다.

식물독소에 관한 연구의 또 다른 방향은 독소에 저항성을 갖는 식물의 개발이다. 일반적으로 식물독소들은 광범위한 항미생물 활성을 갖고 있으므로 독소에 대한 저항성은 대부분 독소를 생산하는 세균에서 기원하고 있다. 대표적인 예로 phaseolotoxin에 저항성을 나타내게 하는 ROCTase를 들 수 있다. 이 효소를 암호화하는 유전자 *argK*는 phaseolotoxin 생산균주인 *P. syringae* pv. *phaseolicola*에서 처음 발견되었다(Mosqueda, 1990). 이 유전자를 클로닝하여 담배에 넣어 형질전환 식물체를 만드는데 성공한 바 있다(Hatziloukas와 Panopoulos, 1992). 이 식물체에서는 *argK* 유전자 산물인 ROCTase가 생산되었고 이 효소에 의해 병원균과 독소에 대하여 저항성을 나타내었다(De La Fuente-Martinez 등, 1992). 마찬가지로 tabtoxin을 acetylation시켜 독성이 없어지게 하는 저항성 유전자인 *ttr*를 담배에 넣어 형질전환 식물체를 만든 바 있다(Anzai 등, 1989).

한편, 식물독소의 생성이 *P. syringae*의 병원형을 결정하는 특징 중 하나이므로 독소의 생합성에 관련된 유전자의 존재 여부를 확인함으로써 병원균을 신속하게 동정할 수 있다. PCR은 이러한 목적을 충족시켜 줄 수 있을 것이다. 특히 자연환경에서 채취된 시료로부터 식물병원 세균을 증폭시킨 다음 PCR을 행하는 BIO-PCR과 nested PCR 등의 방법을 사용하면 식물병의 조기진단도 가능할 것이다.

감사의 말씀

이 연구는 한국과학재단 특정기초연구 과제(KOSEF 98-0402-07-01-3)의 일부로 수행되었음.

참고문헌

- Anzai, H., Yoneyama, K. and Yamaguchi, I. 1989. Transgenic tobacco resistant to a bacterial disease by the detoxification of a pathogenic toxin. *Mol. Gen. Genet.* 219: 492-494.
- Audy, P., Braat, C. E., Saindon, G., Huang, H. C. and Laroche, A. 1996. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. *Phytopathology* 86: 361-366.
- Bachmann, R. C., Ballio, A., Barra, D., Bossa, F., Camoni, L., Di Giorgio, D., Di Nola, A., Ferranti, P., Grgurina, I., Iacobellis, N. S., Lavermicocca, P., Manetti, C., Marchiafava, C., Mriono, G., Mott, K. A., Paci, M., Pucci, P., Scaloni, A., Segre, A., Simmaco, M., Strobel, G. A., Surico, G. and Takemoto, J. Y. 1997. Lipodepsipeptides from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. In : *Pseudomonas syringae pathovars and related pathogens*, ed. by K. Rudolph, T. J. Burr, J. W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian and J. VonKietzell, pp. 170-175. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Ballio, A., Barra, D., Bossa, F., Collina, A., Grgurina, I., Marino, G., Moneti, G., Paci, M., Pucci, P., Segre, A. and Simmaco, M. 1991. Syringopeptides, new phytotoxic lipodepsipeptides of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *FEBS Lett.* 291: 109-112.
- Barta, T. M., Kinscherf, T. G. and Willis, D. K. 1992. Regulation of tabtoxin production by the *lemA* gene in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 174: 3021-3029.
- Barta, T. M., Kinscherf, T. G., Uchytel, T. F. and Willis, D. K. 1993. DNA sequence and transcriptional analysis of the *tbla* gene required for tabtoxin biosynthesis by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 458-466.
- Bazic, M. R. and Guittet, E. 1996. Structure and activity of persicomycins, toxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *persical/Prunus persica* isolate. *Eur. J. Biochem.* 239: 702-709.
- Bender, C. L., Malvick, D. K. and Mitchell, R. E. 1989. Plasmid-mediated production of the phytotoxin coronatine in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *J. Bacteriol.* 171: 807-812.
- Bender, C. L., Alarcón-Chaidez, F. and Gross, D. C. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxin: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 266-292.
- Bender, C. L., Stone, H. E., Sims, J. J. and Cooksey, D. A. 1987. Reduced pathogen fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Tn5 mutants defective in coronatine production. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30: 278-283.
- Benedetti, C. E., Costa, C. L., Turcinelli, S. R. and Arruda, P. 1998. Differential expression of a novel gene in response to coronatine, methyl jasmonate, and wounding in the *Coll* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 116: 1037-1042.
- Bereswill, S., Bugert, P., Volksch, B., Ullrich, M., Bender, C. L. and Geider, K. 1994. Identification and relatedness of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2924-2930.
- Budde, I. P., Rohde, B. H., Bender, C. L. and Ullrich, M. S. 1998. Growth phase and temperature influence promoter activity, transcription abundance, and protein stability during biosynthesis of the *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine. *J. Bacteriol.* 180: 1360-1367.
- Bultreys, A. and Gheysen, I. 1999. Biological and molecular detection of toxic lipodepsipeptide-producing *Pseudomonas syringae* strains and PCR identification in plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1904-1909.
- Cuppels, D. A. and Ainsworth, T. 1995. Molecular and physiological characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* strains that produce the phytotoxin coronatine. *Appl. Environ. Microbiol.*

- 61: 3530-3536.
- De La Fuente-Martinez, J., Mosqueda-Cano, G., Alvarez-Morales, A. and Herrera-Estrella, L. 1992. Expression of a bacterial phaseolotoxin-resistant ornithyl transcarbamylase in transgenic tobacco confers resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Bio/Technology* 10: 905-909.
- Durbin, R. D. 1982. Toxins and pathogenesis, p. 423-441. In M. S. Mount and G. H. Lacy (ed.), *Phytopathogenic prokaryotes*. Academic Press, New York, USA.
- Engst, K. and Shaw, P. D. 1992. Identification of a *lysA*-like gene required for tabtoxin biosynthesis and pathogenicity in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* strain PTBR2.024. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 322-329.
- Engst, K. and Shaw, P. D. 1992. Identification of a *lysA*-like gene required for tabtoxin biosynthesis and pathogenicity in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* strain PTBR2.024. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 322-329.
- Flamand, M. -C., Pelsser, S., Ewbank, E. and Maraite, H. 1996. Production of syringotoxin and other bioactive peptides by *Pseudomonas fuscovaginae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48: 217-231.
- Gardan, L., Shafiq, H. and Grimont, P. A. D. 1997. DNA relatedness among pathovars of *P. syringae* and related bacteria, In: *Pseudomonas syringae pathovars and related pathogens*, ed. by K. Rudolph, T. J. Burr, J. W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian and J. VonKietzell, pp. 445-448. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Gasson, M. J. 1980. Indicator technique for antimetabolic toxin production by phytopathogenic species of *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 25-29.
- Grgurina, I., Gross, D. C., Iacobellis, N. S., Lavermicocca, P. and Takemoto, J. Y. 1996. Phytotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*-syringopeptin production by *sy* mutants defective in biosynthesis and secretion of syringomycin. *FEMS Microbiol. Lett.* 138: 35-39.
- Gross, D. C. and DeVay, J. E. 1977. Production and purification of syringomycin, a phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae*. *Physiol. Plant Pathol.* 11: 13-28.
- Gross, D. C., Scholz-Schroeder, B. K. and Zhang, J. -H. 1998. Characterization of the thiotemplate mechanism of syringomycin and syringopeptin synthesis by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, In: *Molecular genetics of host-specific toxins in plant disease*, ed. by K. Komoto and O. C. Yoder, pp. 91-98. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Gross, D. C. and Grandi, G. 1998. Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster: a link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *J. Biol. Chem.* 273: 32857-32863.
- Hatziloukas, E. and Panopoulos, N. J. 1992. Origine, structure, and regulation of *argK*, encoding the phaseolotoxin-resistant ornithine carbamoyltransferase in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, and functional expression of *argK* in transgenic tobacco. *J. Bacteriol.* 174: 5895-5909.
- Hatziloukas, E., Panopoulos, N. J., Delis, S., Prosen, D. E. and Schaad, N. W. 1995. An open reading frame in the approximately 28-kb *tox-argK* gene cluster encodes a polypeptide with homology to fatty acid desaturases. *Gene* 166: 83-87.
- Hutchison, M. L. and Gross, D. C. 1997. Lipopeptide phytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: comparison of the biosurfactant and ion channel-forming activities of syringopeptin and syringomycin. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 347-354.
- Iacobellis, N. S., Lavermicocca, P., Grgurina, I., Simmaco, M. and Ballio, A. 1992. Phytotoxic properties of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* toxins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 40: 107-116.
- Jung, J. S., Han, H. S., Hur, J. S. and Koh, Y. J. 2001. Identification and characterization of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Submitted for publication.
- Kinscherf, T. G., Coleman, R. H., Barta, T. M. and Willis, D. K. 1991. Cloning and expression of the tabtoxin biosynthetic region from *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 173: 4124-4132.
- Knight, T. J., Durbin, R. D. and Langston-Unkefer, P. J. 1986. Role of glutamine synthetase adenylation in the self-protection of *Pseudomonas syringae* subsp. "*tabaci*" from its toxin, tabtoxinine- β -lactam. *J. Bacteriol.* 166: 224-229.
- Knight, T. J., Durbin, R. D. and Langston-Unkefer, P. J. 1987. Self-protection of *Pseudomonas syringae* pv. "*tabaci*" from its toxin, tabtoxinine- β -lactam. *J. Bacteriol.* 169: 1954-1959.
- Koda, Y. 1992. The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. *Int. Rev. Cytol.* 135: 155-199.
- Liang, L. Z., Sobiczewski, P., Paterson, J. M. and Jones, A. L. 1994. Variation in virulence, plasmid content, and genes for coronatine synthesis between *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* and *P. s. syringae* from *Prunus*. *Plant Dis.* 78:389-392.
- Liu, L. and Shaw, P. D. 1997. Characterization of *dapB*, a gene required by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* BR2.024 for lysine and tabtoxinine- β -lactam biosynthesis. *J. Bacteriol.* 179: 507-513.
- Liyanage, H., Penfold, C., Turner, J. and Bender, C. L. 1995. Sequence, expression and transcriptional analysis of the coronafacate ligase-encoding gene required for coronatine biosynthesis by *Pseudomonas syringae*. *Gene* 153: 17-23.
- Lydon, J. and Patterson, C. D. 2001. Detection of tabtoxin-producing strains of *Pseudomonas syringae* by PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 32: 166-170.
- Mitchell, R. E. 1976. Isolation and structure of a chlorosis-inducing toxin of *Pseudomonas phaseolicola*. *Phytochemistry* 15: 1941-1947.

- Mitchell, R. E. 1991. Implications of toxins in the ecology and evolution of plant pathogenic microorganisms: bacteria. *Experientia* 47: 791-803.
- Mitchell, R. E. and Young, H. 1978. Identification of a chlorosis inducing toxin of *Pseudomonas glycinea* as coronatine. *Phytochemistry* 17: 2028-2029.
- Moore, R. A., Starratt, A. N., Ma, S.-W., Morris, V. L. and Cuppels, D. A. 1989. Identification of a chromosomal region required for biosynthesis of the phytotoxin coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Can. J. Microbiol.* 35: 910-917.
- Moore, R. E., Niemczuca, W. P., Kwok, O. C. H. and Patil, S. S. 1984. Inhibitors of ornithine carbamoyltransferase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Tetrahedron Lett.* 25: 3931-3934.
- Mosqueda, G., Van den Broeck, G., Saucedo, O., Bailey, A. M., Alvarez-Morales, A. and Herrera-Estrella, L. 1990. Isolation and characterization of the gene from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* encoding the phaseolotoxin-insensitive ornithine carbamoyltransferase. *Mol. Gen. Genet.* 222: 461-466.
- Nishiyama, K., Sakai, R. and Ezuka, A. 1976. Phytotoxic effect of coronatine produced by *Pseudomonas coronafaciens* var. *atropurpurea* on leaves of Italian ryegrass. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 42: 613-614.
- Parry, R. J., Mhaskar, S. V., Lin, M. T., Walker, A. E. and Mafoti, R. 1994. Investigations of the biosynthesis of the phytotoxin coronatine. *Can. J. Chem.* 72: 86-99.
- Peñalosa-Vázquez, A. and Bender, C. L. 1998. Characterization of CorR, a transcriptional activator which is required for biosynthesis of the phytotoxin coronatine. *J. Bacteriol.* 180: 6252-6259.
- Penfold, C. N., Bender, C. L. and Turner, J. G. 1996. Characterisation of genes involved in biosynthesis of coronafacic acid, the polyketide component of the phytotoxin coronatine. *Gene* 183: 187-173.
- Prosen, D., Hatziloukas, E., Schaad, N. W. and Panopoulos, N. J. 1993. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region. *Phytopathology* 83: 965-970.
- Quigley, N. B. and Gross, D. C. 1994. Syringomycin production among strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: conservation of the *syrB* and *syrD* genes and activation of phytotoxin production by plant signal molecules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7: 78-90.
- Quigley, N. B., Mo, Y.-Y. and Gross, D. C. 1993. *SyrD* is required for syringomycin production by *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae* and is regulated to a family of ATP-binding secretion proteins. *Mol. Microbiol.* 9: 787-801.
- Rangaswamy, V., Mitchell, R., Ullrich, M. and Bender, C. 1998. Analysis of genes involved in biosynthesis of coronafacic acid, the polyketide component of the phytotoxin coronatine. *J. Bacteriol.* 180: 3330-3338.
- Rhodehamel, N. H. and Durbin, R. D. 1989. Toxin production by strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35: 301-311.
- Sawada, H., Takeuchi, T. and Matsuda, I. 1997. Comparative analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and pv. *phaseolicola* based on phaseolotoxin-resistant ornithine carbamoyltransferase gene (*argK*) and 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 282-288.
- Sinden, S. L. and Durbin, R. D. 1970. A comparison of the chlorosis-inducing toxin from *Pseudomonas coronafaciens* with wildfire toxin from *Pseudomonas tabaci*. *Phytopathology* 60: 360-364.
- Sorensen, K. N., Kim, K. H. and Takemoto, J. Y. 1998. PCR detection of cyclic lipodepsipeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 226-230.
- Stachelhaus, T. and Marahiel, M. 1995. Molecular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 125: 3-14.
- Staskawicz, B. J. and Panopoulos, N. J. 1979. A rapid and sensitive microbiological assay for phaseolotoxin. *Phytopathology* 69: 663-666.
- Stewart, W. W. 1971. Isolation and proof of structure of wildfire toxin. *Nature* 229: 174-178.
- Tamura, K., Takikawa, Y., Tsuyumu, S. and Goto, M. 1989. Characterization of the toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal bacterium of kiwifruit canker. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 55: 512.
- Tomas, M. D. and Durbin, R. D. 1985. Glutamine synthetase from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*: properties and inhibition by tabtoxinine- β -lactam. *J. Gen. Microbiol.* 131: 1061-1067.
- Turner, J. G. and Debbage, J. M. 1982. Tabtoxin-induced symptoms are associated with accumulation of ammonia formed during photorespiration. *Physiol. Plant Pathol.* 20: 223-233.
- Uchytel, T. F. and Durbin, R. D. 1980. Hydrolysis of tabtoxins by plant and bacterial enzymes. *Experientia* 36: 301-302.
- Ullrich, M., Peñalosa-Vázquez, A., Bailey, A. M. and Bender, C. L. 1997. Thermoregulation of coronatine biosynthesis in *Pseudomonas syringae*. In: *Pseudomonas syringae pathogens and related pathogens*, ed. by K. Rudolph, T. J. Burr, J. W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian, and J. VonKietzell, pp 230-235. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Ullrich, M., Peñalosa-Vázquez, A., Bailey, A. M. and Bender, C. L. 1995. A modified two-component regulatory system is involved in temperature-dependent biosynthesis of the *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine. *J. Bacteriol.*

- 177: 6160-6169.
- Ullrich, M. and Bender, C. L. 1994. The biosynthetic gene cluster for coronamic acid, an ethylcyclopropyl amino acid, contains genes homologous to amino acid-activating enzymes and thioesterases. *J. Bacteriol.* 176: 7574-7586.
- Ullrich, M., Bereswill, S., Völksch, B., Fritsche, W. and Geider, K. 1993. Molecular characterization of field isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* differing in coronatine production. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1927-1937.
- Vassilev, V., Lavermicocca, P., Di Giorgio, D. and Iacobellis, N. S. 1996. Production of syringomycins and syringopeptins by *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*. *Plant Pathol.* 45: 316-322.
- Wiebe, W. L. and Campbell, R. N. 1993. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and comparison with *P. s. tomato*. *Plant Dis.* 77: 414-419.
- Young, S. A., Park, S. K., Rodgers, C., Mitchell, R. E. and Bender, C. L. 1992. Physical and functional characterization of the gene cluster encoding the polyketide phytotoxin coronatine in *P. syringae* pv. *glycinea*. *J. Bacteriol.* 174: 1837-1843.
- Zhang, J.-H., Quigley, N. B. and Gross, D. C. 1995. Analysis of the *syrB* and *syrC* genes of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* indicates that syringomycin is synthesized by a thiotemplate mechanism. *J. Bacteriol.* 177: 2772-2778.
- Zhang, J.-H., Quigley, N. B. and Gross, D. C. 1997. Analysis of the *syrP* gene, which regulates syringomycin synthesis by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2771-2778.
- Zhang, Y. X. and Patil, S. S. 1997. The *phtE* locus in the phaseolotoxin gene cluster has ORFs with homologies to genes encoding amino acid transferases, the AraC family of transcriptional factors, and fatty acid desaturases. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 947-960.
- Zhang, Y., Rowley, K. B. and Patil, S. S. 1993. Genetic organization of a cluster of genes involved in the production of phaseolotoxin, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* 175: 6451-6464.