

*Erwinia rhapontici*의 Pectate Lyase 유전자 Cloning

최재을* · 김권규 · 한광섭¹
충남대학교 농과대학, ¹충남농촌진흥원

Cloning of Pectate Lyase Gene in *Erwinia rhapontici*

Jae Eul Choi*, Kwon Kyoo Kang and Kwang Sup Han¹

Department of Agronomy, College of Agriculture,

Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

¹Chungnam Provincial Rural Development Administration, Taejon 305-308, Korea

ABSTRACT: *Erwinia rhapontici* causes soft-rot disease in a number of plants such as onion, garlic and hyacinth. There has been no report that *E. rhapontici* produces pectate lyase. *Pel* gene was cloned from genomic DNA of the parasitic soft-rot *E. rhapontici* polymerase chain reaction by using synthetic oligonucleotide primers designed from the *pel 1* of *E. carotovora*. The recombinant plasmid pJE101 containing pectate lyase gene, when introduced into *E. coli* DH5a, produced pectate lyase and macerated hyacinth tissue..

Key words: *Erwinia rhapontici*, soft rot, pectate lyase gene, polymerase chain reaction.

세균에 의한 무름병은 재배기간 뿐만 아니라 저장중이나 운반중에도 발생하여 막대한 피해를 주는 병(14)으로 주요 증상은 식물의 무름증상 (maceration)이다. 고등식물의 세포벽은 cellulose, hemicellulose, pectin질, 단백질 등으로 구성된 1차 세포벽과 pectin질이 주성분으로 구성된 중층으로 되어있다. 그러므로 세포벽의 분해에는 각종 펙틴질 분해효소, cellulase, hemicellulase, protease 등이 관여하며 이 중에서도 펙틴질 분해효소가 조직붕괴에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(7). 펙틴질 분해효소로는 pectinmethylesterase, polygalacturonase, pectate lyase(Pel), pectin lyase, oligogalacturonate lyase가 있으며, 식물 병원세균의 병원성과 가장 밀접한 관계가 있는 pectate lyase는 펙틴산의 α -1,4 glucoside 결합을 무작위로 절단하여 β -脫離에 의해 235 nm에서 최대 흡수를 갖는 4,5불포화 oligogalacturonate를 생산한다. 효소반응에는 Ca^{2+} 를 요구하고 pH 범위는 8.0~10.0의 강한 알칼리성측에 위치하는 것이 다른 pectinase의 성질과 다른 점이다(7, 10). 무름병을 일으키는 *E. carotovora*와 *E. chrysanthemi*는 여러 종류의 Pel isozyme이 존재하며(10), *E. chrysanthemi* B 374에서 단리된 Pel 유전자들은 5개의 Pel isozyme

(Pel a-Pel e)을 생산하는 5개의 유전자로 이루어져 있으며, 이들은 염색체상에 *pel B*와 *C*, *Pel A*, *D*, *E*의 두 group으로 존재한다고 하였다(16).

양파, 마늘, 히아신스 등에 무름병을 일으키는 *E. rhapontici*(4, 8, 13, 18)는 soft rot의 기본효소인 pectate lysae를 생산하지 않아 본 균의 병원성의 본질이 무엇인가에 대한 의문이 제기되어 왔다. 그러나 최근 최(3)는 *E. rhapontici*를 감자, 배추 등에 인공접종한 결과 다른 *Erwinia* group과 동일한 조직붕괴 증상을 나타냈으며, 붕괴된 조직에서 Pel이 검출되었고, 이 효소는 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 등이 생산한 Pel과 같이 감자의 괴경을 붕괴시키고, 세포로부터 전해질의 유출 등을 유발한다고 하였다. 그러나 이 효소가 *E. rhapontici*의 병원성과 어떤 관련이 있는지에 관하여는 아직까지 밝혀지지 못하고 있다.

*E. carotovora*나 *E. chrysanthemi*와는 Pel 생산 기작이 다른 *E. rhapontici*에 있어서 Pel 유전자의 분리를 시도하였으나, Pel 효소의 생산을 유도하는 인공배지 system이 없어 직접 genomic DNA clone으로부터 이 유전자의 분리를 할 수 없었다(미발표 결과). 따라서 본 연구는 *E. rhapontici*의 *pel* 유전자가 병원성 발현과 어떠한 관계가 있는지를 구명하기 위하여 *E. carotovora*의 *pel 1* 유전자의 exon 부분이 포함되도록 인공합성한 primer를 사용하여, DNA를

*Corresponding author.

증폭하고, 유전자를 분리하여 *E. coli*에서의 발현 유무에 관하여 조사하였다.

재료 및 방법

균주, plasmid, 배지. 본 시험에 공시한 *Erwinia rhapontici*는 미국의 University of Missouri에서, *E. coli*(DH5α)와 plasmid(pKJ101)는 일본의 東北大學 遺傳生態 研究室에서 분양받아 사용하였다. 균의 배양은 Luria Bertani(LB) 배지와 minimal salts(MS) 배지(1, 12)를 사용하였으며, Pel의 생성은 poygalacturonate yeast agar 배지에서 조사하였다(2).

Pel 활성측정. Pel 활성은 Starr 등(20)이 보고한 방법으로 실시하였다. 0.26 ml의 reaction buffer(0.5 M Tris-HCl, pH 8.5, 0.06 M CaCl₂), 0.24 ml의 polygalacturonate(5.75 mg/ml), 0.1 ml의 증류수 또는 균배양액을 혼합하여 30°C에서 분광광도계로 235 nm에서 흡광도를 측정하였다. Pel 활성단위는 1분간에 흡광도를 1 증가시키는 효소량을 1 unit로 하였다.

Plasmid 핵산의 분리. *E. carotovora*의 *pel 1* 유전자가 포함된 plasmid(pNN101)(9)를 갖고 있는 *E. coli*(DH5α)를 ampicilin(50 µg/ml)이 첨가된 200 ml의 LB배지에 단일 clone을 접종한 후 37°C에서 약 12 시간 진탕배양하여 3,000 rpm에서 10분간 원심, alkali lysis의 방법으로 분리하였다(1).

***E. rhapontici* 게놈 핵산 분리.** 단일 colony의 *E. rhapontici*를 30 ml의 LB배지에서 16 hr 배양(30°C) 후 3,000 rpm에서 5분간 원심하여 상등액을 버리고 5,670 µl의 TE buffer로 균체를 현탁 후, 300 µl의 10% SDS와 30 µl(20 mg/ml)의 proteinase k로 잘 혼합, 37°C에서 1시간 보온하였다. 그리고 1,000 µl의 5 M NaCl과 800 µl의 CTAB/NaCl Solution(10% CTAB, 0.7 M NaCl)를 넣고 65°C에서 10분간 방치한 후, 8.0 ml의 chloroform-isoamylalcohol(1:1)을 5분 동안 잘 섞어 3,000 rpm에서 5분간 원심하였다. 상등액을 같은 양의 phenol:chloroform(24:1)로 2번 추출한 후 상등액을 새로운 튜브에 옮겨, 5,400 µl의 isopropanol을 혼합, 12,000 rpm에서 5분간 원심하여 상등액을 버리고 2,000 µl의 70% ethanol로 씻은 후 진공건조하여 1,000 µl의 TE buffer에 녹여 사용하였다(1).

Southern hybridization. *E. rhapontici*로부터 분리한 total DNA를 여러 종류의 제한효소(*Hind*III, *Eco*RI, *Pst*I, *Bam*HI, *Sph*I, *Xho*I, *Sma*I, *Sac*I)로 처리하였다. 이 시료를 0.8% agarose gel 전기영동(5 V/cm)으로 분리한 후 나이론 membrane(Hybond N⁺)에 흡착시켰다. Southern hybridization을 위한 probe는 *E. carotovola*로부터 분리한 *pel I* 유전자의 단편(Fig. 3)을 non-radio labelling하여, hybridization, washing 및 detection은 DIG-system법으로 실시하였다.

Agarose gel로부터 probe DNA 단편의 회수 및 labeling. Probe에 사용할 insert DNA를 회수하기 위하여 pNN101(9)을 *Pst*I과 *Hpa*I로 절단한 다음 0.5 µg/ml의 ethizium bromide를 포함한 0.8~1.5%의 TBE agarose gel로 전기영동한 후 UV transilluminator하에서 *pel I* 유전자 부분을 포함하고 있는 0.5 kb 단편을 잘라낸 후에 Gene clean II kit(BIO 101, USA)로 분리하였다. 분리된 DNA는 DIG labelling kit(BM, Germany)로 표식하여 Southern blot 분석에

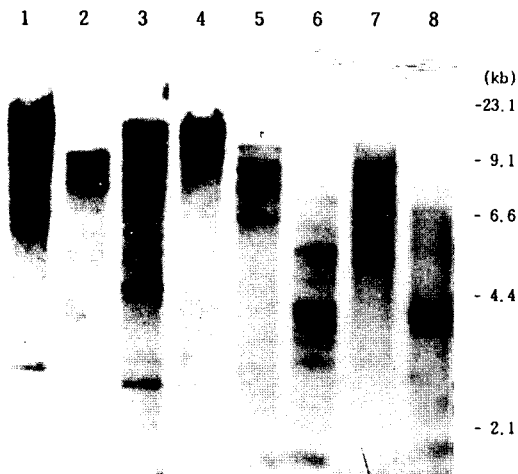


Fig. 1. Southern hybridization of *E. rhapontici* genomic DNA. Digated genomic DNA was hybridized with 0.5 Kb of *pel 1* probe of plasmid pNN101 (Ito *et al.*, 1988). The various lanes contained *E. rhapontici* DNA digested with lane 1: *Xho*I; lane 2: *Sph*I; lane 3: *Sma*I; lane 4: *Sac*I; lane 5: *Bam*HI; lane 6: *Eco*RI+*Hind*III; lane 7: *Hind*III; lane 8: *Eco*RI, respectively.

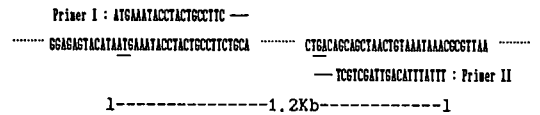


Fig. 2. Oligonucleotide primers for PCR amplificaton. The two central sequence lines show both strands of the pectate lyase gene of *E. carotovora*. The oligos I and II used for the assembly of the *pel* coding sequence were chemically synthesized using a Takara DNA synthesis. Each oligo was purified 15% PGAE, excision of the EtBr-stained band, extraction from the gel slice, and fractionation through a Sephadex G-25 column.

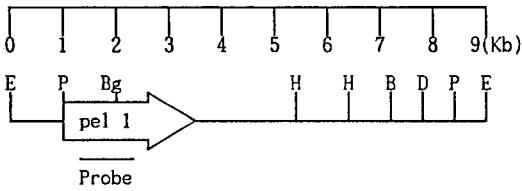


Fig. 3. Gene probe for pectate lyase gene was derived from DNA fragments cloned in plasmid pNN101 (Ito *et al.*, 1988). E: *EcoRI*; P: *PstI*; Bg: *BglII*; H: *HindIII*; B: *BamHI*; D: *DraI*.

이용하였다.

PCR(polymerase Chain Reaction)법에 의한 유전자 증폭. Primer의 합성은 DNA Thermal Cycler (Takara, Japan)를 이용하여 *E. carotovora pel 1* 유전자(9)의 exon부분이 포함되도록 forward primer (primer I)과 reverse primer(primer II)를 각각 20 bp씩 합성하였다(Fig. 2). DNA의 증폭은 Gene Amp PCR Reagent kit(Takara, Japan)를 사용하였다.

주형 DNA는 앞에서 분리한 *E. rhapontici* genomic DNA를 사용하였으며, 반응조건은 100 μ l의 혼합액 (genomic DNA 10 ng, primer I과 II 각각 25 pmole, dNTP 25 pmole, Taq polymerase 0.5 units)을 95°C에서 5분간 1 cycle, 그리고 95°C 1분, 58°C에서 2분, 72°C에서 4분간을 1 cycle로 하여 25 cycle로 수행하였다.

Ligation 및 *E. coli* DH5 α 로 형질전환. PCR로 증폭한 DNA를 T4 DNA ligase를 사용하여 *EcoRI* adaptor를 부착한 다음, DNA 5'말단의 탈인산화하여 vector pKJ 10 μ l에 ligation시켰다. 형질전환은 10 μ l의 plasmid 용액 또는 ligation 반응액에 얼음 중에서 녹인 100 μ l의 competent cell를 가하여, 얼음 중에서 30분간 방치한 다음, 42°C에서 90초간 보온 후 얼음 중에서 5분간 방치하였다. 900 μ l의 LB배지를 가하여 37°C에서 1시간 보온한 후, ampicillin이 포함된 LB배지에 plating 하여 37°C에서 하루밤 배양하여 형질전환체를 얻었다.

Colony hybridization. 형질전환된 *E. coli* DH5 α clones을 100 μ g/ml ampicillin이 포함된 LB 한천배지에서(37°C) 배양하여, 직경이 수 mm되도록 균락을 형성시켰다. 그 위에 membrane을 놓아 균을 충분히 묻힌 뒤에 ampicillin이 포함된 새로운 LB 한천배지에 균이 묻은 면이 위로 오도록 놓고 균락 직경이 수 mm가 되도록 37°C에서 배양하고 denaturing solution에 7분간 침적한 후 종이 타올 위에 놓아 여분의 수분을 제거한 후 neutralizing buffer에 침적한 여지

위에 3분간 두었다가, 종이 타올로 여분의 수분을 제거한 다음, 2x SSC로 균락이 없는 면을 씻고 집락의 면을 위로하여 종이 타올 위에서 풍건시키고, membrane을 랩으로 싸서 집락면을 아래로 하여 UV transilluminator 위에 놓고 5분간 UV를 쬐인 다음, hybridization을 실시하였다.

PYA 배지에 의한 *pel* 활성을 갖는 *E. coli* clone의 검출. Colony-hybridization으로 선발한 *E. coli* clone을 ampicillin이 포함된 LB배지에 배양하고, 표면 살균된 마늘잎을 배양균 위에 올려 놓고 PYA 배지에서 5일간 배양한 샤레를 chloroform으로 30분간 처리하여 30°C에서 하루밤 동안 방치시킨 다음 4N HCl을 배지에 부어 균락 주위가 halo를 형성한 *E. coli* clone을 Pel활성 clone으로 선발하였다.

결 과

*E. rhapontici*의 multiple *pel* 유전자. *E. rhapontici*에서 *pel* 유전자의 copy수를 추정하기 위하여 *E. rhapontici* genomic DNA를 제한효소 *XhoI*, *SphI*, *SmaI*, *SacI*, *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*로 처리한 후 high stringency washing condition을 이용하여 Southern blotting하여 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다. 처리한 효소의 종류에 따라 band의 pattern은 다양하게 나타났으며, *EcoRI*으로 처리하였을 경우 4.2 Kb 부근에 2개의 band가 밀접하게 형성되었다. 제한효소 지도나 genomic structure에 관한 결과가 없기 때문에 이 Southern blot만으로 정확한 copy수는 알 수 없으나, *E. rhapontici*는 적어도 *pel* 유전자가 2개 이상의 copy가 존재할 것으로 추정된다.

Pel 유전자의 cloning. *E. rhapontici* genomic DNA에 *E. carotovora Pel 1* 유전자의 양 말단의 염기배열을 인공합성한 primer I과 II를 가하여 PCR로 DNA를 증폭시켜, 0.9% agarose gel에서 전기영동한 결과 1개의 band를 형성하였다. PCR에 의해 증폭된 DNA를 *EcoRI* adaptor를 부착시킨 DNA를 plasmid pKJ101에 T4 ligase로 ligation(Fig. 4)한 다음 *E. coli*에 transformation시켜 선택배지에서 선발한 결과 500여개의 clone을 얻을 수 있었다. 이것을 앞에서 사용한 probe로 colony hybridization을 실시한 결과 28개의 positive clone을 선발할 수 있었다.

PYA plate에 의한 *pel* 활성 clone의 선발. 위에서 선발한 28개의 clone을 PYA plate에서 투명한 반점을 형성시키는 Pel positive clone 5개를 선발하였다. 선발된 clone의 plasmid를 분리하여 *EcoRI* 효소로

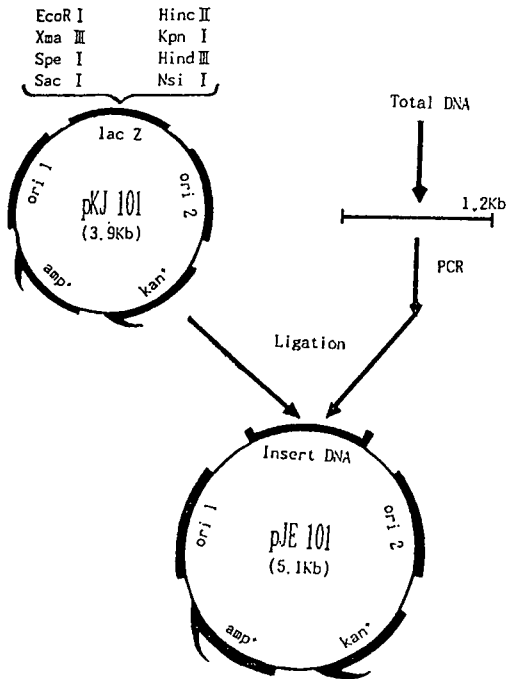


Fig. 4. Construction of the plasmid pJE101. The bold line represents inserted DNA segment. pKJ101 (3.9 Kb) was constructed with pUC118 vector and PBI101 (Kan, Resistant gene). Pectate lyase gene (1.2 Kb) was isolated from genomic DNA of *E. rhapontici* by PCR using synthetic oligonucleotide primers (I, II) that were designed from the *pel* 1 of *E. carotovora*.

처리하여 분석한 결과 1.2 Kb의 DNA 단편이 삽입된 것을 확인하였다.

클로닝된 pectate lyase 유전자의 선발 및 *E. coli*에서 발현. pJE101에 삽입된 *E. rhapontici*의 pectate lyase 유전자가 *E. coli*에서 발현정도를 구명하기 위하여 pectate lyase 활성을 측정하였다. Table 1에서와 같이 *E. rhapontici*는 MS배지에 PGA나 pectin과 함께 배추 조직을 첨가하면 효소활성이 0.35~0.15 units/ml였으나, *pel* 유전자가 cloning된 plasmid를 함유한 *E. coli*에서는 효소활성이 0.22~0.14 units/ml로 약간 감소하는 경향이였다.

pel 유전자를 갖고 있는 *E. coli*의 병원성. *E. rhapontici*의 *pel* 유전자가 cloning된 plasmid를 갖고 있는 *E. coli*는 접종 36시간 후에 구근을 약간 붕괴시켰으나, *E. rhapontici*를 접종한 구근에 비하여 부패시기가 약간 늦고 진전도 매우 완만하였다. *E. coli*는 히야신스 구근에 접종한 결과 구근을 전혀 부패시키지 않았다.

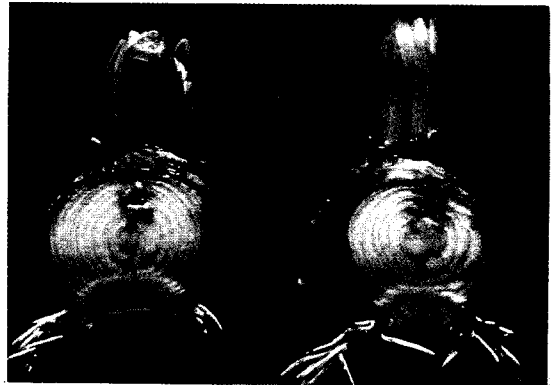


Fig. 5. Symptoms of hyacinth bulbs inoculated with *E. rhapontici* (A) and *E. coli* containing *pel* gene (B). The bulbs were inoculated and cut 48 hrs after anaerobic inoculation. Tissues around the inoculation site with each strain were completely macerated.

Table 1. Effect of nutrient source and plant tissues on pectate lyase production of *E. rhapontici* and *E. coli* carrying pectate lyase gene cloned from *E. rhapontici*

Minimal salts medium ^a supplement with	Pel ^b activity (units/ml)	
	Er1 ^c	DH52α (pJE101) ^d
Glucose	0	0
Glycerol	0	0
Polygalacturonate	0	0
Pectin	0	0
PGA+Chinese cabbage	0.35	0.22
Pectin+Chinese cabbage	0.15	0.14

^aThe MS solution contained KH₂PO₄, 0.7%; K₂HPO₄, 0.2%; MgSO₄·7H₂O, 0.7%; (NH₄)₂SO₄, 0.1%; and was supplemented with glycerol (0.5%), luucose (0.5%), polygalacturonate (0.5%) and Chinese cabbage tissue (0.5%).

^bPectate lyase.

^c*Erwinia rhapontici* strain 1.

^d*E. coli* containing pectate lyase gene cloned from *E. rhapontici*.

고 찰

Soft rot group에 속하는 식물병원세균의 중요한 특성은 polygalacturonate를 분해하고 gelatin을 용해하나 *E. rhapontici*는 polygalacturonate의 분해나 gelatin을 용해하지 않는(11) 특성을 갖고 있다. 그러나 이 균은 soft-rot와 관련된 효소는 전혀 밝혀지지 않고 있어 본 균의 병원성에 많은 의문점을 갖게 되었다. 그러나 최(3)는 최근에 *E. rhapontici*에 의해 붕괴된

감자와 배추조직 내에서 Pel을 최초로 검출하였으며, 이 효소는 감자의 괴경 붕괴, 세포로부터 전해질 물질의 유출시키는 등 다른 soft-rot 세균이 생성한 Pel과 동일한 기능을 갖고 있다고 하였다.

저자 등은 식물조직 내에서 Pel을 생산하는 *E. rhapontici* 유전자를 cloning하고, 그 기능을 해석하기 위하여 *E. rhapontici* genomic DNA library 작성하고 Pel 유전자가 cloning된 clone을 선발하려 하였으나, *E. rhapontici*는 인공배지에서 Pel을 생산하지 못하는 특성 때문에 clone 선발이 불가능하였다. 그러므로 *E. carotovora pel 1* 유전자 양 말단의 염기배열을 인공합성한 primer I와 II를 *E. rhapontici* genomic DNA에 가하여 PCR로 DNA를 증폭시켜 pKJ101에 ligation시킨 후 *E. carotovora Pel 1*을 probe로 colony hybridization하여 양성인 clone을 선발할 수 있었으나, 이 clone들도 PYA배지에서는 Pel을 생산하지 못하였다. 본 균이 식물조직 내에서 Pel을 생산하는 특성을 고려하여 PYA배지에 균을 접종하고 그 위에 조직배양한 감자괴경이나 표면 멸균한 마늘잎을 올려 놓아 Pel을 유도시킨 결과, Pel 양성 clone을 얻을 수가 있었다.

그러나 cloning된 *pel* 유전자를 갖고있는 *E. coli*는 본래의 *E. rhapontici*보다 낮은 Pel활성을 나타냈으며, 감자와 히아신스의 조직을 약하게 붕괴시켰다. 이러한 결과는 *E. rhapontici*의 *pel* 유전자의 promoter가 vector의 promoter와 다른데 기인하거나, 복수의 *pel* 유전자 중에서 한개의 유전자만이 cloning되었기 때문일 것으로 생각된다.

또한, Pel유전자를 갖고 있는 *E. coli*가 감자괴경 등을 붕괴시키는 것은 *E. rhapontici*의 Pel유전자가 병원성과 밀접한 관계가 있다는 것을 의미한다. 그러나 본 균은 식물조직내 또는 식물조직이 첨가된 배지에서만 Pel을 생산하고 기주범위가 좁은 것은 다른 soft-rot 세균과 효소유도 및 생산체계가 다를 것으로 생각되며, *E. rhapontici*가 Pel 유도물질인 polygalacturonate를 탄소원으로 이용할 수 없는 성질 과도 관련이 있을 것으로 생각된다.

E. carotovora subsp. *carotovora*나 *E. chrysanthemi*는 식물체(15), 식물 추출(21, 22), 식물 세포벽(5) 뿐만 아니라 polygalacturonate 및 분해물에 의해서도 Pel이 합성되나(6). *E. rhapontici*는 식물조직이 존재할 때만 Pel을 유도하는 것으로 미루어 보아 Pel 유도 물질은 기주 인식과 관련이 있을 것으로 추정되며, 병원성과 식물간의 상호작용에 있어서 분자생물학적 연구에 중요한 소재로 이용될 수 있을 것으로 예상된다.

요 약

*Erwinia rhapontici*는 양파, 마늘, 히아신스와 같은 식물에 무름병을 일으키는 식물병원 세균이나, 이 균의 pectate lyase 생산에 관한 보고는 전혀 없다. *E. carotovora*의 *pel 1* 유전자의 염기배열로 설계하여 oligonucleotide primer를 합성하였으며, *E. rhapontici*의 polymerase chain reaction한 genomic DNA 으로부터 *pel*유전자를 cloning하였다. Pectate lyase 유전자가 재조합된 plasmid pJE101가 도입된 *E. coli* DH5 α 는 Pel을 생산하였으며, 히아신스조직을 붕괴 시켰다.

감사의 말씀

본 연구는 1992년도 문교부 유전공학 학술연구조성비에 의한 결과입니다.

참고문헌

1. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, D., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. 1990. *Current protocols in molecular biology*. Green Publishing Associates and Willey. Interscience, New York, U.S.A.
2. Chatterjee, A. K., Buchanan, G. E., Behrens, M. K. and Starr, M. P. 1979. Synthesis and excretion of polygalacturonic acid transeliminase in *Erwinia*, *Yaersinia*, and *Klebsiella* species. *Can. J. Microbiol.* 25: 94-102.
3. Choi, J. E. 1994. Pectate lyase production in *Erwinia rhapontici* during bacterial growth in hosts. *Korean J. Plant Pathol.* (in press).
4. 최재을, 한광섭. 1989. 백합과 채소의 세균성 부패병에 관한 연구 2. *Erwinia*속 세균에 의한 마늘 무름병. *한식병지* 5: 271-276.
5. Collmer, A. and Bateman, D. F. 1981. Impaired induction and self-catabolite repression of extracellular pectate lyase in *Erwinia chrysanthemi* mutant deficient in oligogalacturonide lyase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 3929-3924.
6. Collmer, A., Durward, F. and Bateman, F. 1982. Regulation of Extracellular pectate lyase in *Erwinia chrysanthemi*: evidence that reaction products of pectate lyase and exo-poly-a-D-galacturonosidase mediate induction on D-galacturonan. *Physiol. Plant Pathol.* 21: 127-139.
7. Collmer, A. and N. T. Keen, N. T. 1986. The rate of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Ann. Rev.*

- Phytopathol.* 24:383-409.
8. 한광섭, 최재율. 1989. 백합과 채소의 세균성 부패병에 관한 연구 1. 양파 부패를 일으키는 *Erwinia*속 세균의 동정. 충남대 농과연보 16:19-25.
 9. Ito, K. Kobayashi, R. Nikaido, N. and Izaki, K.1988. DNA structure of pectate lyase I gene cloned *Erwinia carotovora*. *Agric. Biol. Chem.* 52:479-487.
 10. Kotoujansky, A. 1987. Molecular genetics of pathogenesis by soft-rot *Erwinias*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25:405-430.
 11. Lelliott, R. A. and Dicey, R. S. 1984. Genus *Erwinia*. In *Bergey's manual of Systemic Bacteriology*. Vol. I. ed. by Krieg, N. R. and Holt, J. G. pp.469-476. Williams and Wikins G., Baltimore, London.
 12. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sanbroot, J. 1982. *Molecularcloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 13. Ouchi, A., Oshawa, T. and Nishimura, J. 1983. Two pathogenic bacteria, *Erwinia rhapontici* (Millard 1924) Burkholder 1948 and *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* (Brown1918) Stevens 1925, causing a soft rot of onion. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 49:619-626.
 14. Perombelon, M. C. M. and Kelman, A. 1980. Ecology of the soft rot erwinia. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18:361-387.
 15. Quantick, P., Cervone, F. and Wood, R. K. S. 1983. Isoenzymes of a polygalacturonate *trans*-eliminase produced by *Erwinia atroseptica* in potato tissue and in liquid culture. *Physiol. Plant Pathol.* 22:77-86.
 16. Reverchon, S. and Robert-Baudouy, J. 1987. Regulation of expression of pectate lyase genes *pel A*, *pel D*, and *pel E* in *Erwinia chrysanthemi*. *J. of Bacteriol.* 169:2417-2423.
 17. Reverchon, S. Robert-Baudouy, J. 1987. Regulation of expression of pectate lyase genes *pel A*, *pel D* and *pel E* in *Erwinia chrysanthemi*. *J. of Bacteriol.* 169:2417-2423.
 18. Sellwood, J. E. and Lelliott, R. A. 1978. Internal browning of hyacinth caused by *Erwinia rhapontici*. *Pl. Path.* 27:120-124.
 19. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments. *J. Mol. Biol.* 98:503-537.
 20. Starr, M. P., Chatterjee, A. K., Starr, P. B. and Buchanan, G. E. 1977. Enzymatic degradation of polygalacturonic acid by *Yersinia* and *Klebsiella* species in relation to clinical laboratory procedures. *J. Clin. Microbiol.* 6:379-396.
 21. Tomizawa, H., Izaki, K. and Takahashi, H. 1970. Stimulation of pectolytic enzyme formation of *Erwinia aroideae* by an active factor in carrot extracts part II. Partial purification of the factor and the stimulating effect of some other compounds. *Agr. Biol. Chem.* 34:1064-1070.
 22. Tsuyumu, S, Funakubo, T. Hori, H. Takikawa, Y. and Goto, M. 1985. Presence of DNA damaging agents in plant as the possible inducers of pectic lyase of soft-rot *Erwinia*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 56:294-302.