

*E. coli*에서 근류균 섬유소 분해효소 유전자의 발현 및 생화학적 특성조사

윤호종 · 박용우 · 임선택 · 강규영 · 윤한대*
경상대학교 농화학과

Expression and Biochemical Characterization of CMCCase Gene of *Rhizobium fredii* USDA193 in *Escherichia coli*

Ho-Jong Yun, Yong-Woo Park, Sun-Tech Lim,
Kyu-Young Kang and Han-Dae Yun*

Department of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

Abstract — From the plasmid pYA300 carrying a CMCCase of *Rhizobium fredii* USDA193 plasmid was subcloned into pBluescript II KS(+)/pBluescript II SK(+) vectors and designated pYA500 and pYA600, respectively. *Escherichia coli* cells transformed with pYA500 produced the CMCCase more than with pYA600. The orientation of the cloned fragment in pBluescript vector had the effect on gene expression in *E. coli* background. When the 1.7 kb CMCCase gene fragment of *R. fredii* USDA193 was hybridized to *Eco*RI-digested total DNA from *R. meliloti* and *R. fredii* USDA 191 the unique bands hybridized respectively, indicating that some genetic diversity exists in the *Eco*RI restriction enzyme site for CMCCase gene in *Rhizobium* strains. The optimum pH of enzyme activity was 7 and the optimum temperature of that was nearly 37°C. The cellulase-minus derivatives of pYA500 were constructed by Tn5 insertional mutation. Among 6000 transconjugants, two mutant plasmids (designated pYA500::Tn5a and pYA500::Tn5b) were detected from the cellulase-negative transconjugants. The product of CMCCase gene was analyzed by one dimensional SDS-PAGE of the cell extracts. About 45 kDa protein was considered to be a product of CMCCase gene.

*Rhizobium fredii*는 fast growing group에 속하는 대두(Peking) 근류균으로 Keyser 등(2, 3)에 의해 처음으로 보고되었으며 저자 등(4, 5)에 의해 보고된 바가 있다. 근류형성은 근류균과 두과작물의 상호작용에 의해 초기 단계에서 근류균이 기주식물의 근모(root hair) 내로 들어가는 데 이때 식물 세포벽의 polysaccharide와 glycoprotein의 딱딱한 복합체의 성질은 근류균으로 하여금 기주 특이성의 벽을 이룬다(6). 근류균이 근류를 형성하는 초기 과정에서 근모의 matrix를 이완시켜 기주식물로 들어갈 때 기주식물의 표피세포(epidermal cell)에 polygalacturonase, cellulase, hemicellulase 등의 세포벽 분해에 관련되는 효소가 작용할 것으로 추정하고 있다(7-12). 근류형성 과정에서 근류균에 의하여 생성되는 세포벽 분해효소의 양은 매우 적고 근류형성 초기에 일시적으로 생성될 것이며 기주식물과 상호 관련하여 그 활성이

고도로 조절되어 있는 것으로 생각된다. 만약 이들이 조절되어 있지 않고 세포벽 분해효소가 계속적으로 분비되면 기주식물 세포벽을 필요 이상으로 분해하여 식물병원균이 기주식물을 와해시키는 것과 같이 근류형성을 유산시키는 결과를 가져올 것이다. McCoy 등(13)은 식물병원균이 세포벽 가수분해효소에 의한 식물세포벽 침투 시와 같은 방법으로 근류균에 의한 두과작물의 근류형성과정에서도 근류균 세포벽 분해효소가 관련될 가능성을 처음으로 연구하였으며 근류균 배양물에서 cellulase(14, 15), pectic enzymes(16-21), hemicellulase(8, 11)의 존재가 보고되었다. 최근에는 이에 관련된 연구로 근류형성 초기과정의 기작을 구명하기 위해 분자생물학적 접근을 시도하고 있다(1, 22-24).

저자들은 전보(1)에서 *Rhizobium fredii* USDA193 균주의 genomic DNA로부터 gene bank를 만들어 이 중에서 CMCCase 활성을 가진 clone을 선별하여 *E. coli*에 발현되는 정도를 비교하였으며 이를 subcloning 하여 1.7 kb 크기의 CMCCase gene을 보고한 바가 있

Key words: *Rhizobium fredii*, CMCCase gene, gene expression

*Corresponding author

다. 따라서 본 연구에서는 *Rhizobium* CMCCase gene의 상동성 실험, 생화학적 특성 및 Tn5 돌연변이법에 의한 유전자 산물을 조사하여 *E. coli*에서 발현 특성을 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

사용균주 및 plasmid

본 실험에 사용된 균주 및 plasmid는 Table 1과 같고 *Rhizobium*의 배양은 Beringer 방법(25)에 준하였으며 *E. coli* 균주는 LB 배지에 적절한 항생제 농도를 첨가하여 사용하였으며 pYA300의 유전자 지도는 Fig. 1과 같다.

섬유소 분해효소 활성 측정법

DNS 법(26)에 의한 활성 측정은 1% CMC(carboxy methyl cellulose)가 함유된 액체 배지에서 1주일간 배양한 여액을 조효소 액으로 사용하였으며 CMC를 0.1 M-phosphate-citric acid buffer(pH 6)에 1% 되게 기질 용액을 만든 다음 효소 반응 후 550 nm에서 흡광도법으로 측정하였다. 고체배지에서의 활성 측정을 위해 Congo red plate 법(27)으로 CMC가 1% 되게 첨가한 기본 고체배지에서 균을 2일간 배양한 다음 Congo red 용액으로 15분간 염색시킨 후 다시 1 M-NaCl 용액으로 처리하여 생성되는 yellow ring의 크기로 활성 정도를 측정하였다.

Total DNA 및 plasmid DNA 분리

Total DNA는 Hirsch 방법(28), plasmid DNA는 Holmes와 Quigley 방법(29)에 준하였고 제한효소 절단 등 일반적인 recombinant DNA 기술은 Sambrook 등(30)의 방법에 준하였다.

효소의 생화학적 특성 조사

효소의 생화학적 특성을 조사하기 위하여 CMC를 기질로 하여 최적 pH, 최적온도를 조사하였으며 경시적 변화를 관찰하였다(31).

CMCase gene의 Tn5 돌연변이 유발

pJB4J1(32)는 5.7 kb 크기의 Tn5를 함유하고 있는 plasmid로 kanamycin(km) 저항성이 있으며, 이는 pYA500 clone에 도입시 CMCCase gene을 변이시키는 것으로 pJB4J1과 pYA500을 overnight 배양하여 membrane filter 상에서 mating 시킨 다음 ampicillin과 kanamycin을 첨가한 LB 고체배지 상에 생육하는 코로니를 선별하여 Congo red plate 법에 의하여

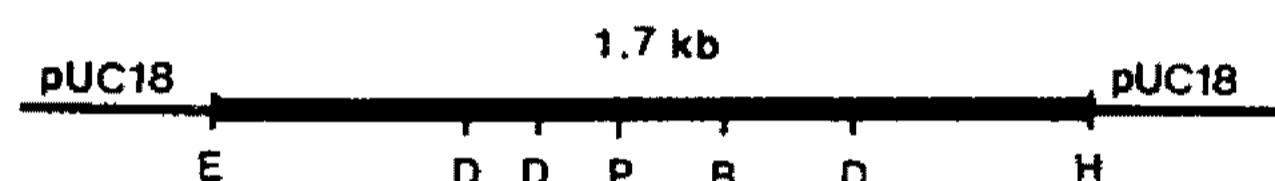


Fig. 1. The restriction maps of the 1.7 Kb *EcoRI-HindIII* fragment of pYA300. The light bars represent the cloning sites of pUC18.

Abbreviation for restriction enzyme sites are as follows: E, *EcoRI*; D, *DraI*; P, *PvuII*; B, *BglII*; H, *HindIII*

Table 1. Bacteria strains and plasmids employed

Strains/plasmids	Characteristics	Sources
<i>Rhizobium fredii</i> USDA193	Nod ⁺ , Fix ⁻ , on soybean cv, Peking	Keyser (2)
<i>Rhizobium fredii</i> USDA191	Nod ⁺ , Fix ⁻ , on soybean cv, Peking	Keyser (2)
<i>Rhizobium meliloti</i> TAL1372	Nod ⁺ , Fix ⁻ , on alfalfa	Niftal
<i>E. coli</i> XL1-Blue	φ 80d <i>lacZ</i> ΔM15; <i>end</i> A1, <i>rec</i> A1; <i>hsd</i> R17 (r ⁻ , m ⁻), <i>supE</i> 44, <i>thi</i> -1, λ- <i>gyrA</i> , <i>rel</i> A1, F ⁻ , Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, Tc ^r	Stratagene Co.
pBluescriptII KS ⁻	Cloning vector, Amp ^r , M13, T ₃	Stratagene Co.
pBluescriptII SK ⁻	Cloning vector, Amp ^r , M13, T ₃	Stratagene Co.
pJB4J1	Tn5, Tn7, Km ^r , Gn ^r	Ely <i>et al</i> (32)
pYA300	1.7 kb <i>BglII-HincII</i> fragment of pYA200 carrying the <i>cel</i> gene in pUC18	Yun <i>et al</i> (1)
pYA500	1.7 kb <i>EcoRI-HindIII</i> fragment of pYA300 carrying the <i>cel</i> gene in pBluescript II KS ⁻	This work
pYA600	1.7 kb <i>EcoRI-HindIII</i> fragment of pYA300 carrying the <i>cel</i> gene in pBluescript II SK ⁻	This work
pYA500::Tn5a	<i>cel</i> mutant of pYA300	This work
pYA500::Tn5b	<i>cel</i> mutant of pYA300	This work

cellulase 활성이 나타나지 않는 균주를 선별하였다.

SDS-PAGE에 의한 cel 유전자 산물 확인

상기 Tn5 돌연변이에 의해 얻어진 *cel*⁻ 변이주와 pYA500 균주의 균체를 처리하여 Laemmli의 SDS-Tris-Glycin buffer system과 Studier의 discontinuous slab gel electrophoresis system을 사용하여 CMCase 유전자 산물을 확인하였다(31, 33).

결 과

CMCase gene의 subcloning

CMCase gene을 함유하고 있는 pYA300을 pBlues-

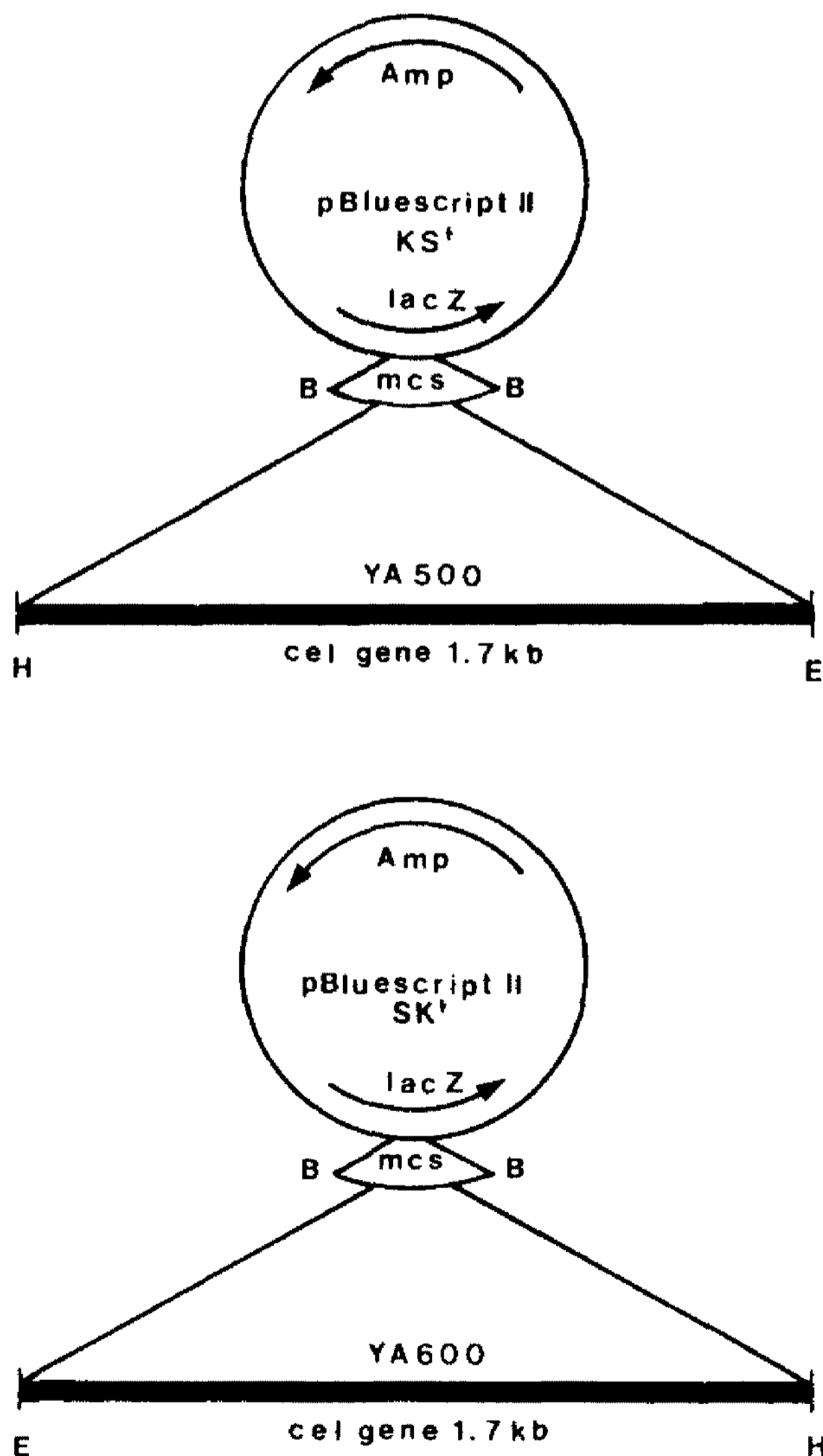


Fig. 2. *Rcel* (*Rhizobium* cellulase gene: 1.7 Kb *Eco*RI-*Hind*III fragment) cloned into pBluescript II KS⁺ (pYA 500) and pBluescript II SK⁺ (pYA600). Abbreviation for restriction enzyme sites are as follows: H, *Hind*III; E, *Eco*RI

cript II KS(+)/pBluescript II SK(+) vector에 다시 크로닝하여 각각 pYA500, pYA600으로 명명하였다 (Fig. 2). pYA500의 CMCase 활성이 pYA600보다 더 높았는데 이것은 vector 내에 크로닝된 방향에 따라 유전자 발현에 영향을 미치는 것으로 생각된다(Fig. 4, 7).

CMCase gene의 상동성 실험

R. fredii USDA193 *cel* gene의 1.7 kb의 단편을 probe로 사용하여 *R. meliloti*와 *R. fredii* USDA191 total DNA를 *Eco*RI으로 처리한 것과 상동성을 조사한 결과는 Fig. 3와 같다. Fig. 3에서와 같이 *R. fredii* USDA193 *cel* gene은 *R. fredii* USDA191 균주와는 같은 위치에서 상동성을 나타내었으며 *R. meliloti*에서는 상이한 위치에서 상동성을 나타내었다.

CMCase gene의 효소학적 특성

섬유소 분해효소 활성의 최적 pH 및 최적온도는

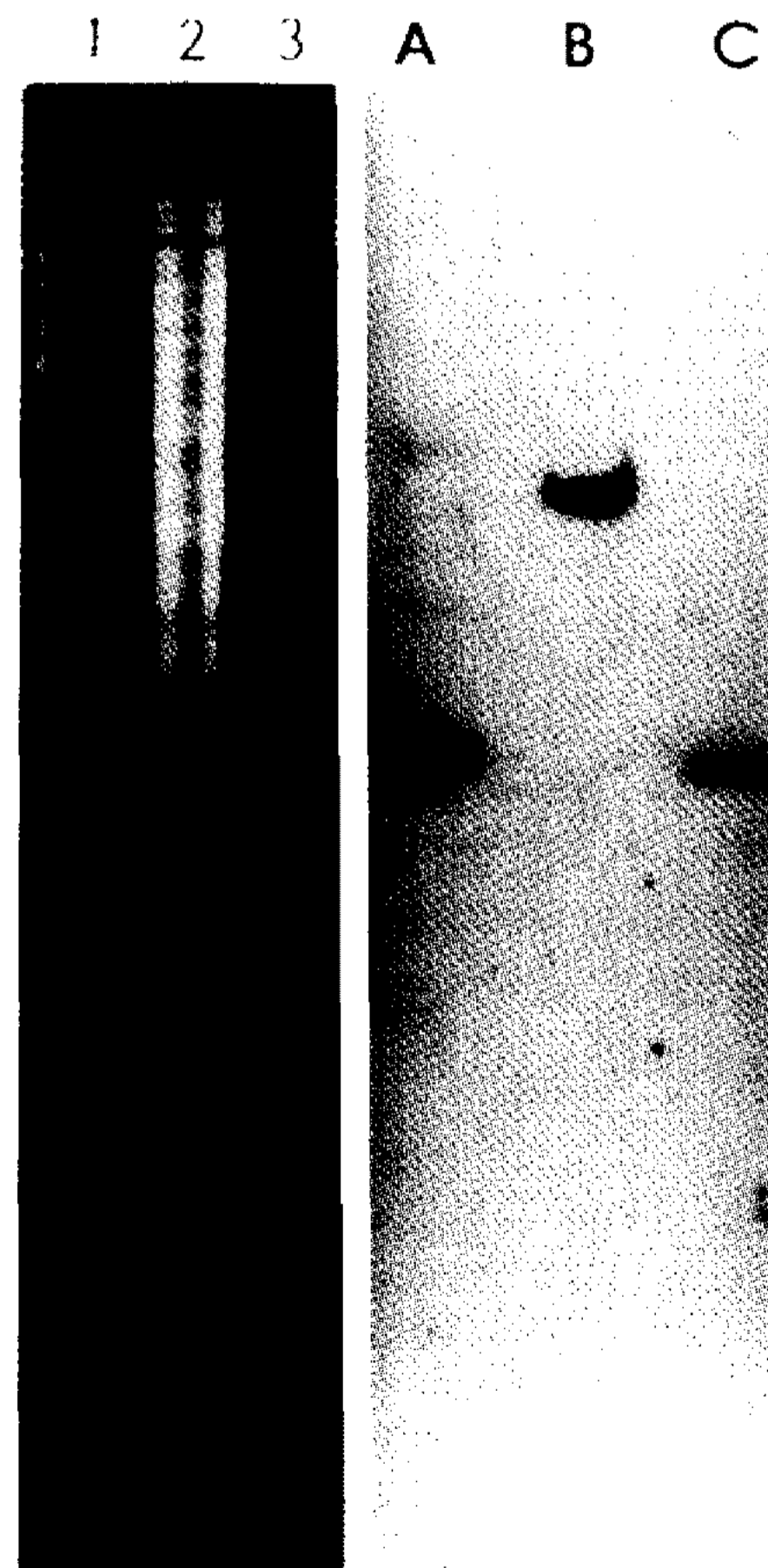


Fig. 3. (a) Agarose gel electrophoresis of *Eco*RI-digested total DNA isolated from *Rhizobium* strains. Lane 1, λ /Pst1, *Rhizobium fredii* USDA193, 2. *Rhizobium meliloti* TAL1372, 3. *Rhizobium fredii* USDA191. (b) Hybridization of labelled CMCase gene insert from *Rhizobium fredii* USDA193.

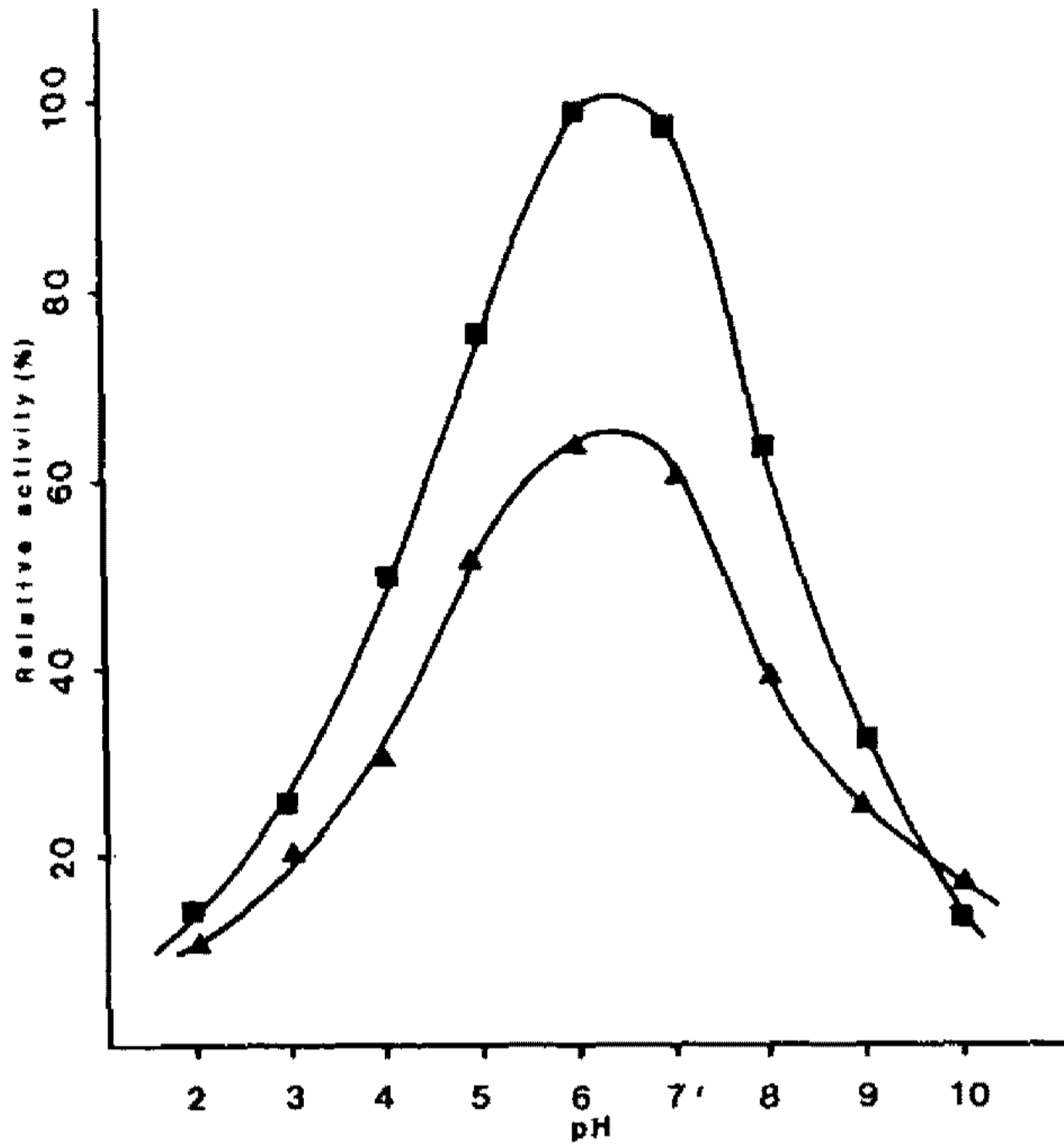


Fig. 4. Effect of pH on CMCase activity by pYA500 and pYA600.

—■—: pYA500, —▲—: pYA600

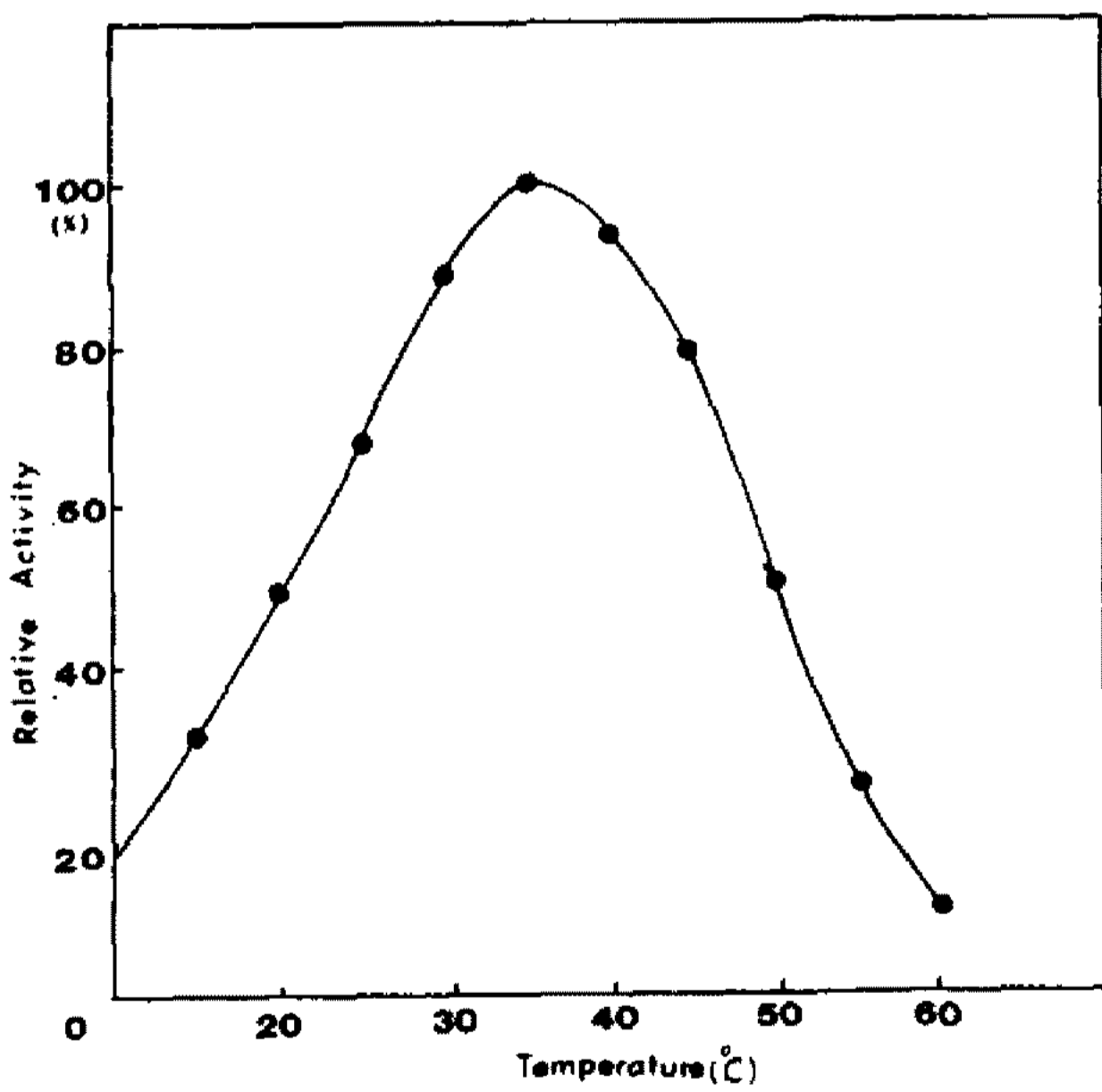


Fig. 5. Effect of the temperature on CMCase by pYA500. All assays were conducted at pH 6 in the 0.1 M-phosphate-citric acid buffer

각각 Fig. 4와 5와 같다. pH에 따른 효소 활성의 변화는 pH 7 부근에서 pYA500, pYA600 모두 최대치를 이루며 산성 쪽 및 알칼리성 쪽으로 갈수록 효소활성은 낮았다(Fig. 4). 온도에 따른 활성 변화로써 37°C 부근에서 최대 활성치를 나타내었다(Fig. 5). 한편 YA500을 1% CMC 첨가배지에서 7일간 배양시키면서

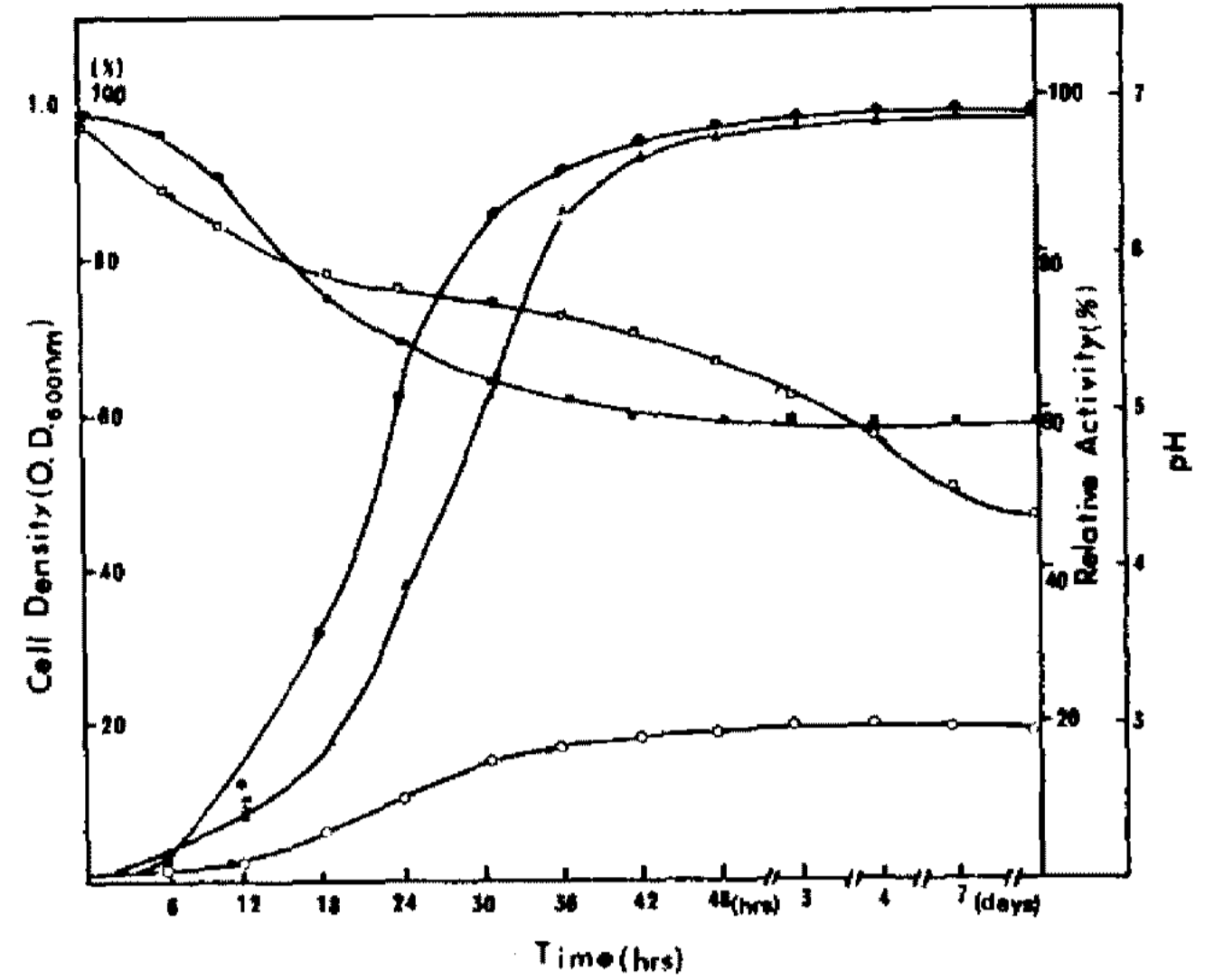


Fig. 6. Time course of CMCase by pYA500 in LB-CMC broth.

—●—: cell density, —▲—: relative activity of CMCase, —□—: pH, —■—: relative viscosity of CMC, —○—: relative activity of cell-bounded CMCase

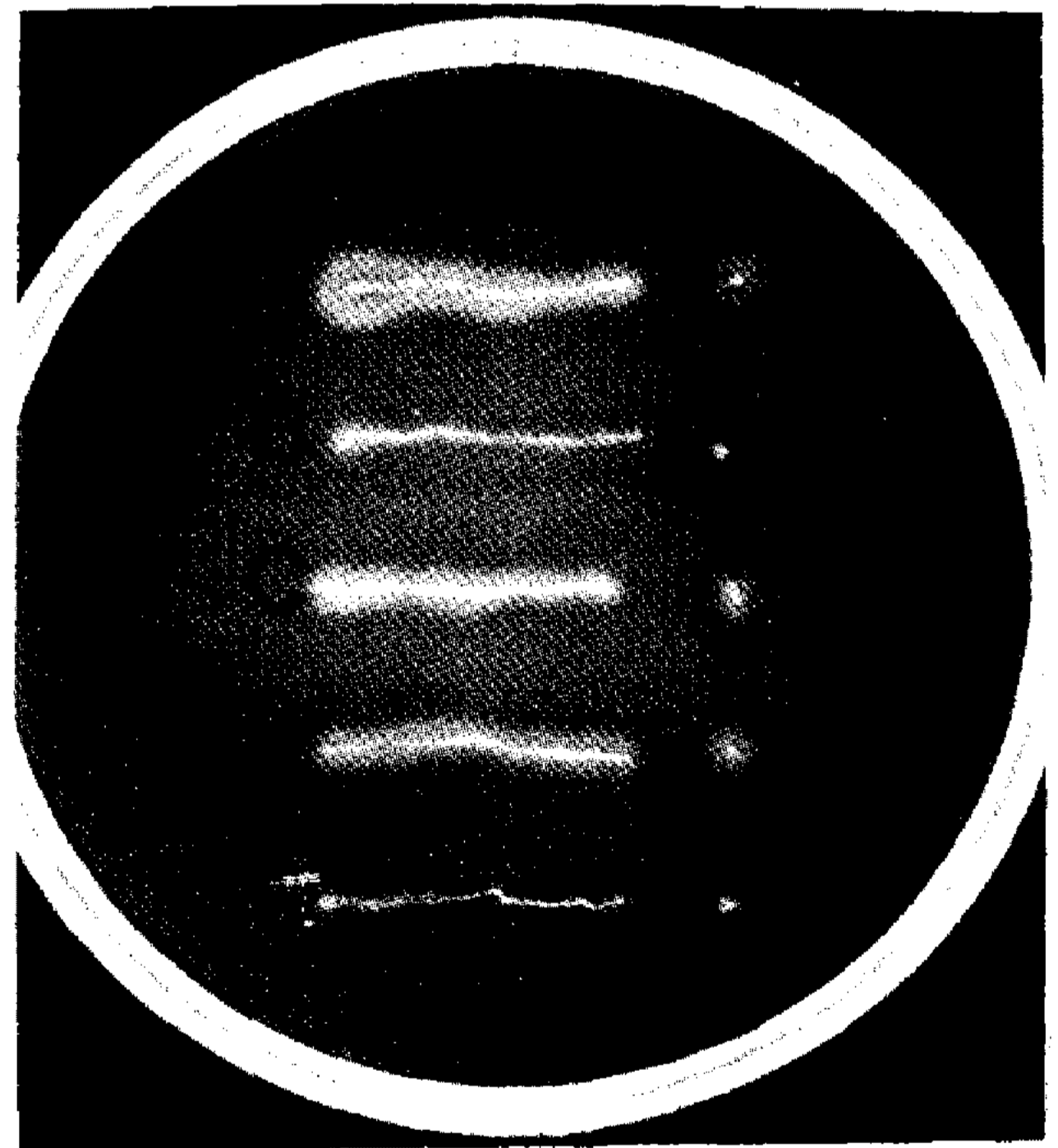


Fig. 7. Colonies of *E. coli* strain producing CMCase activity by Congo red.

A, pYA500; B, pYA500::Tn5a; C, pYA300; D, pYA600; E, *E. coli* XL1-Blue

경시적으로 관찰한 결과는 Fig. 6에서 보인 것처럼 균의 생장은 3일에서 최대치를 이루며 배지의 점도는 4일까지 감소하다가 그 이후에는 감소하지 않았다. 섬유소 분해효소의 활성은 3~6일까지 최대치를 이루었다.

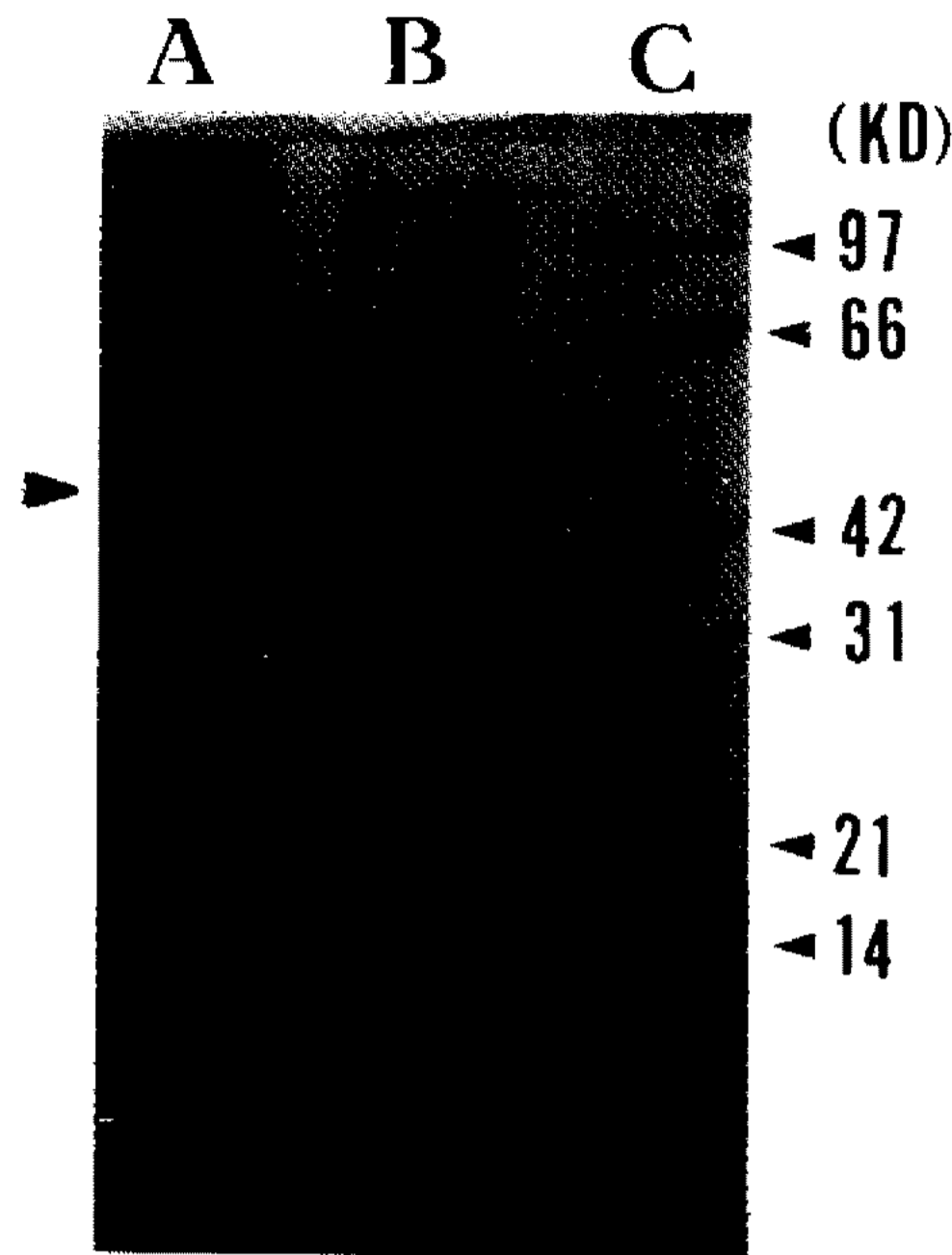


Fig. 8. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of total protein in *E. coli* containing CMCase gene. Lane A, pYA500; B, pYA500::Tn5a; C, protein standard marker.

Tn5에 의한 섬유소 분해효소 clone의 돌연변이

Tn5를 함유한 kanamycin에 저항성을 가진 pJB4J1으로 cellulase clone pYA500에 돌연변이를 시도한 결과 6000여 항생물질 저항성 clone 중에서 효소활성이 없는 두 변이주(pYA500::Tn5a 및 pYA500::Tn5b)를 선별하였다(Fig. 7).

SDS-PAGE에 의한 CMCase gene 산물 확인

*E. coli*에 크로닝된 CMCase gene의 발현산물을 확인하기 위해 Tn5로 처리한 변이균주와 일차원 SDS-PAGE에 의한 단백질을 분석한 결과는 Fig. 8과 같다. Fig. 8에서처럼 CMCase gene 함유 균주에서 변이 균주(lane B)의 단백질 양상의 차이를 관찰할 수 있었으며 약 45 kDa 크기의 유전자 산물을 확인하였다. 이 결과는 현재 실험 중인 DNA sequencing 결과(Data not shown)와 거의 일치하였다. 상이한 균주를 구별하는 데는 SDS-PAGE에 의한 세포 단백질을 분석함으로써 그 차이를 쉽게 확인할 수 있다. 한편 세포의 배양시기 즉, 대수증식기와 정상기에 따라서 단백질 형태가 달라질 수 있는데 일반적으로 정상기에 도달하면 동일한 것으로 나타난다. 따라서 본 실험에서는 정상기까지 배양한 세포를 분석하였다.

고 찰

*Rhizobium*에서 cellulase나 hemicellulase의 존재를

확인한 바 있으나 근류형성과정에 있어 그 역할을 구체적으로 밝히지 못하였다(7,9). Molales 등(15)은 *Rhizobium trifolii* 균주에서 생성된 cellulase는 endo- β -1,4-glucanase라고 밝힌 바가 있으며, 이 효소의 활성은 *Rhizobium*의 capsule 물질과 관련되어 있는 것으로 추정하였으며 Chalifour 등(14,15)은 *Rhizobium*의 periplasmic space에서 β -galactosidase를 분리 보고한 바가 있다. 그러나 아직까지 *Rhizobium*에서 cellulase를 순수 정제하거나 그 특성을 조사하고 분자생물학적인 접근을 시도한 바가 적은 실정이다.

전보(1)에서 저자들은 *R. fredii* USDA193 균주로부터 cosmid vector인 pLAFR3를 사용하여 genomic library를 얻어 CMCase 활성을 가지는 clone을 분리 보고한 바가 있다. 본 실험에서는 *R. fredii* USDA193에서 크로닝된 1.7 kb CMCase gene의 특성에 관련되는 크로닝 방향, 상동성 실험, 생화학적 특성, 돌연변이 등을 실험하였다. 먼저 크로닝 방향을 달리 하여 그 발현 정도를 조사한 결과 효소 활성이 상이함을 알았는데 이는 유전자가 구조적으로 조절 부위를 가지는 것으로 생각된다. 이러한 사실은 근류형성 초기 단계에서 섬유소 분해효소가 극히 순간적으로 발현되고 근류균이 기주식물에 들어 간 후에는 그 발현이 정지되어 기주식물이 와해되지 않게 조절되는 작용과 관련될 것으로 생각된다(7). 앞으로 이 유전자의 구조 분석을 계속 진행하여 발현 개시에서 기주식물과 관련 여부를 조사하면 이 유전자의 발현기작에 보다 접근할 수 있을 것으로 생각된다. 그리고 이 유전자를 probe로 하여 *R. meliloti* 및 *R. fredii*의 다른 균주와 상동성 실험을 한 결과 하나의 band가 나타났는데 *Rhizobium* 내에는 CMCase gene이 single gene으로 존재하였다. 한편 Shantharam 등(24)은 *R. fredii* USDA193에는 *pelB* 및 *pelE* 두 종류의 pectate lyase 유전자가 존재하는 것으로 보고한 바가 있는데 근류균 내에는 식물세포벽 분해효소 종류가 다양하게 존재할 것으로 생각된다. Chung 등(23)은 *R. fredii* USDA193을 marker-exchange 법에 의하여 *pel*⁻ mutants를 만들어 근류형성 정도를 관찰한 결과 근류형성 초기과정에서 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났는데 이것은 초기 근류형성과정에서 세포벽 분해효소가 복합적으로 작용하는 것이 아닌가 생각된다.

한편 이 유전자에 대한 DNA sequencing 한 결과 ORF 부위는 확인되었으나 promoter의 SD 부위가 발견되지 않아 일반적인 유전자 구조와는 상이한 것이 아닌가 생각되며 이에 대한 실험을 계속 중에 있다. 아울러 *R. meliloti*에서 CMCase 유전자를 분리하여

유전자 구조를 확인하고 있으며 이를 비교 검토하면 앞으로 유전자 구조에 대한 정확한 해석이 가능할 것으로 생각된다. Standal 등(34)은 *Acetobacter xylinum*에서 섬유소분해에 관련되는 유전자(ORF1)가 cellulose 합성에 관련되는 *bcs* operon에 함께 위치하여 cellulose 합성에 필요하다는 것을 보고하였으며, 최근 흥미있는 보고로 Matthysse 등(35)도 *Rhizobium*과 가장 근연 관계가 있는 *Agrobacterium tumefaciens*에서도 섬유소 분해효소인 *celA*를 분리하여 cellulose 합성에 관련되는 동일 operon에 위치하여 cellulose 합성에 필수적임을 밝힌 바가 있다. 이에 관련하여 본 연구자들도 Napoli 등(36)이 *Rhizobium trifolii*에서 cellulose microfibrils를 생성한다는 보고를 근거로 하여 근류균에서도 섬유소 분해효소 유전자가 cellulose 합성과 관련되어 있을 것으로 생각되어 이에 대한 실험을 계속 수행 중에 있다.

앞으로 이 유전자의 조절작용에 대한 연구가 더욱 촉구되며 앞으로 얻어진 결과를 토대로 하여 *cel* gene의 구조적 차이 및 조절 기능을 연구하여 근류균의 근류형성과정의 초기 작용기작을 이해하는데 더욱 접근할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 근류균의 초기 근류형성 기작이 구명되면 이를 기초로 하여 식물병원균의 세포벽 초기 침투기작에 관한 분자생물학적 접근을 위한 model도 될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

본 실험은 대두 근류균(*Rhizobium fredii* USDA193)의 세포벽 분해효소 유전자를 조사하기 위해 *Rhizobium fredii* USDA 193 균주의 genomic DNA library로부터 선별한 1.7 kb CMCase gene을 함유한 섬유소 분해효소 유전자의 발현특성을 *E. coli*에서 조사하였다. 이 유전자의 크로닝 방향을 달리하기 위해 pBluescript II KS⁺(pYA500)와 pBluescript II SK⁻(pYA600)에 각각 재크로닝하여 CMCase 활성을 조사한 결과 pYA500에서 효소 활성이 증가되었으며 이 유전자를 probe로 하여 같은 fast growing group에 속하는 *R. meliloti*와 상동성 실험을 한 결과 서로 상동성이 관찰되었다. 이 효소의 생화학적 특성으로 최적 효소활성 온도는 37°C 부근이었으며 최적 pH는 7 근방이었다. 또한 Tn5(pJB4JI)를 pYA500에 삽입하여 CMCase mutant를 얻었으며 이들의 SDS-PAGE에 총 단백질의 양상을 비교한 결과 이 유전자 산물의 단백질 분자량은 약 45 kDa에 달하는 것으로 추정하였다.

감사의 말

이 논문은 교육부 유전공학연구비(1992) 및 한국과학재단(SRC for PMBBRC)에 의하여 연구되었으며, 귀 재단의 연구비 지원에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Yun, H.D., S.T. Lim, and K.Y. Kang. 1990. Molecular cloning of the cell-wall degrading enzyme in *Rhizobium*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 203-208.
2. Keyser, H.H., B.B. Bohlool, T.S. Hu, and D.F. Weber. 1982. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybeans. *Science* **215**: 1613-1633.
3. Sadowsky, M.J., H.H. Keyser, and B.B. Bohlool. 1983. Biochemical characterization of fast- and slow-growing rhizobia that nodulate soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**: 716-722.
4. Yun, H.D., M.J. Cho, and K.H. Lee. 1987. Isolation and characterization of rhizobia from soybean cultivated in Korea. *J. Kor. Agric. Chem.* **30**: 153-162.
5. Yun, H.D., M.J. Cho, and K.H. Lee. 1987. Identification of *Rhizobium fredii* and *Bradyrhizobium japonicum* by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Kor. Agric. Chem.* **30**: 163-168.
6. Al-Mallah, M., R. Davey, and E.C. Cocking. 1987. Enzymatic treatment of clover root hairs removes a barrier to *Rhizobium*-host specificity. *Bio/Technology* **5**: 1319-1322.
7. Mateos, P.F., J.I. Jimenez-Zurdo, J. Chen, A.S. Squartini, S.K. Haack, E.M. Molina, D.H. Hubbell, and F.B. Dazzo. 1992. Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* Biovar *Trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1816-1822.
8. Lopez, M. and E. Signer. 1987. Degradative enzymes in *Rhizobium meliloti*. Pp. 185-187. In D. Verma and N. Brisson (ed.). *Molecular Genetics of Plant-microbe Interaction*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
9. Bakhuizen, R., P. van Spronsen, and J. Kijne. 1988. Cell wall degradation and infection thread initiation in pea root cortical cells during infection by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. Pp. 83-107. In R. Bakhuizen, *The Plant Cytoskeleton in the Rhizobium-legume Symbiosis*. Ph. D. Dissertation, University of Leiden, The Netherlands.
10. Verma, D., V. Zogbi, and A. Bal. 1978. A cooperative action of plant and *Rhizobium* to dissolve the host cell wall during development of root nodule symbiosis. *Plant Sci. Lett.* **13**: 137-142.
11. Martinez-Molina, E., V. Morales, and D. Hub-

- bell. 1979. Hydrolytic enzyme production of *Rhizobium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**: 1186-1188.
12. Ridge, R. and B. Rolfe. 1985. *Rhizobium* species degradation of legume root hair cell wall at the site of infection thread origin. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 717-720.
 13. McCoy, E. 1932. Infection by *Bact. radicum* in relation to the microchemistry of the host's cell walls. *Proc. R. Soc. London Ser. B* **110**: 514-533.
 14. Chalifour, F. and A. Benhamou. 1989. Indirect evidence for cellulase production by *Rhizobium* in pea root nodules during bacteroid differentiation: cytochemical aspects of cellulose breakdown in rhizobial droplets. *Can. J. Microbiol.* **35**: 821-829.
 15. Moralse, V., E. Martinez-Molina, and D. Hubbell. 1984. Cellulase production by *Rhizobium*. *Plant and Soil* **80**: 407-415.
 16. Hubbell, D.H., V.M. Morales, and M. Umali-Garcia. 1978. Pectolytic enzymes in *Rhizobium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 210-214.
 17. Palomares, A., E. Montoya, and J. Olivers. 1978. Induction of polygalacturonase production in legume roots as a consequence of extrachromosomal DNA carried by *Rhizobium meliloti*. *Microbios* **21**: 33-39.
 18. Planzinski, J. and B.G. Rolfe. 1985. Analysis of the pectolytic activity of *Rhizobium* and *Azospirillum* strains isolated from *Trifolium repens*. *J. Plant Physiol.* **120**: 181-187.
 19. Ljunggren, H. and G. Fahraeus. 1961. The role of polygalacturonase in root-hair invasion by nodule bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **26**: 521-528.
 20. Martinez-Molina, E. and J. Olivares. 1982. A note on evidence for involvement of pectolytic enzymes in the infection process of *Medicago sativa* by *Rhizobium meliloti*. *J. Appl. Bacteriol.* **52**: 453-455.
 21. Prasuna, P. and S. Ali. 1987. Detection and characterization of two thermally reactive pectinases in cultures of *Rhizobium*. *Ind. J. Exp. Biol.* **25**: 632-633.
 22. Lim, S.T., M.H. Chung, Y.W. Park, and H.D. Yun. 1991. Molecular cloning of the pectate lyase gene from *Rhizobium fredii* USDA193. *Mol. Cells* **1**: 151-156.
 23. Chung, M.H., Y.W. Park, and H.D. Yun. 1991. Marker-exchange mutagenesis of pectate lyase gene in *Rhizobium fredii*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 222-227.
 24. Shantharam, S.H., H.D. Yun, D. Swanlund, and A. Atherly. 1988. Identification and cloning of two pectate lyase genes from *Rhizobium fredii* USDA193, Pp. 202-203. In R. Palacios and D. Verma (ed.), *Molecular Genetics of Plant-microbe Interactions*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minn. USA.
 25. Beringer, J.E. 1974. R factor transfer in *R. japonicum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**: 188-198.
 26. Sumner, J.B. and E.B. Sisler. 1944. A simple method for blood sugar. *Arch. Biochem.* **4**: 333-336.
 27. Teather, R. and P.J. Wood. 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 770-780.
 28. Hirsch, P.R., M. van Montagu, A.W.B. Johnston, N.J. Brewin, and J. Schell. 1980. Physical identification of bacterocinogenic, nodulation and other plasmids in strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **120**: 403-412.
 29. Holmes, D.S. and M. Quigley. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
 30. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and M. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vol. 1, 2, 3. Cold Spring Harbor, New York.
 31. Park, Y.W. 1992. The role of *cel* gene in *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* on bacterial leaf blight. M.S. Dissertation, Gyeongsang National University, Korea.
 32. Ely, B. and R.H. Croft. 1982. Transposon mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **149**: 620-625.
 33. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680-685.
 34. Standal, R., T.G. Iversen, D.H. Coucheron, E. Fjaervik, J.M. Blatny, and S. Valla. 1994. A new gene required for cellulose production and a gene encoding cellulolytic activity in *Acetobacter xylinum* are colocalized with the *bcs* operon. *J. Bacteriol.* **176**: 665-672.
 35. Matthyse, A.G., S. White, and R. Lightfoot. 1995. Genes required for cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **177**: 1069-1075.
 36. Napoli, C., F. Dazzo, and D. Hubbell. 1975. Production of cellulose microfibrils by *Rhizobium*. *Appl. Microbiol.* **30**: 123-131.

(Received 23 March 1995)