

مقایسه تنوع ژنتیکی جدایه‌های باکتری *Erwinia amylovora* در خوشه‌های ژنی *hrp*، *ams* و *dsp* و پلاسمید pEA29

The comparison of genetic diversity of *Erwinia amylovora* strains *hrp*, *ams* and *dsp* gene clusters and pEA29 Plasmid

سمیرا رهیده^۱، حمید عبداللهی^{۲*}

۱- کارشناس ارشد واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲- دانشیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج

Rahideh S¹, Abdollahi H^{*2}

1. MSc Student, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Associate Professor, Seed and Plant Improvement Institute

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: HamidAbdollahi@spii.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۲)

چکیده

باکتری *Erwinia amylovora* عامل بیماری آتشک در درختان میوه دانه‌دار می‌باشد. به منظور بررسی رابطه شدت بیماری‌زایی با خصوصیات ژنتیکی جدایه‌ها، در تحقیق حاضر، تنوع ژنتیکی سه خوشه ژنی دخیل در بیماری‌زایی شامل *hrp*، *ams* و *dsp* با استفاده از نشانگر PCR-RFLP مورد مقایسه قرار گرفت. علاوه بر این تنوع پلاسمید pEA29 باکتری با استفاده از جفت آغازگر PEANT بررسی شد. جدایه‌های مورد استفاده شامل ۱۷ جدایه از میزبان‌های بومی ایران و جدایه Ea273 از آمریکا بود. پس از طراحی آغازگرهای اختصاصی بر روی خوشه‌های ژنی مذکور و انجام واکنش PCR، محصولات با آنزیم‌های *TaqI*، *SalI*، *PstI*، *MboI*، *HhaI*، *BglII*، *AluI* مورد هضم قرار گرفتند. به علاوه، ۵ محصول PCR خوشه ژنی *ams* در ۵ جدایه با منشا جغرافیایی مختلف توالی‌یابی شدند. نتایج حاصل هیچ گونه تنوعی را در محل اتصال و طول باند آغازگرهای خوشه‌های ژنی مختلف نشان نداد. به علاوه هضم با آنزیم‌های محدود کننده، در کلیه جدایه‌ها الگوی هضم یکنواختی را ایجاد کرد. توالی‌یابی محصولات PCR خوشه ژنی *ams* نیز به طور کامل مشابهت نشان دادند که حاکی از حفاظت شدگی بسیار بالای ژنوم در این خوشه ژنی بود. بررسی تنوع ناحیه تکثیر شده توسط آغازگرهای PEANT روی پلاسمید pEA29 مؤید تفاوت در طول و توالی این ناحیه در جدایه‌های مختلف بود. به نظر می‌رسد میزان حفاظت شدگی موجود در این پلاسمید بسیار پائین‌تر از ژنوم باکتری باشد.

واژه‌های کلیدی

بیماری آتشک،
تنوع ژنتیکی،
خوشه‌های ژنی *hrp*،
Ams
dsp

مقدمه

باکتری *Erwinia amylovora* عامل بیماری آتشک، تهدیدی جدی برای طیف وسیعی از زیرخانواده دانه‌دارها^۱ در سطح جهان به حساب می‌آید (Duffy et al. 2005; Norelli et al. 2003). این بیماری از هر پنج قاره دنیا و در بیش از چهل کشور گزارش شده (van der Zwet and Bonn 1999) و سالانه خسارات اقتصادی فراوانی خصوصاً در درختان به، گلابی و سیب ایجاد می‌نماید. باکتری عامل بیماری آتشک، بی‌هوازی اختیاری، گرم منفی بوده و دمای بهینه رشد ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (Billing et al. 1961). این باکتری اولین باکتری بیماری‌زای گیاهی می‌باشد که با شناسایی آن رشته جدید باکتری‌شناسی گیاهی به علم بیماری-شناسی گیاهی افزوده شد (Shtienberg et al. 2000).

علائم عمده بیماری شامل بلایت شکوفه‌ها، نکروز، سیاه‌شدگی و سرعصابی شدن سرشاخه‌هاست. در شرایط مرطوب، تراوشات باکتریایی در سطوح آلوده، میوه‌های نارس، تنه و شاخه‌ها جریان یافته و شانکر در پوست درخت مشاهده می‌شود. این بیماری برای اولین بار در سال ۱۳۶۸ در ایران، در باغی واقع در برغان کرج مشاهده شد (Zakeri and Sharifnabi 1991). بیماری آتشک، هم‌اکنون در بسیاری از مناطق کشور از جمله استان‌های تهران، مرکزی، سمنان، آذربایجان شرقی و غربی، اردبیل، قزوین، زنجان، کردستان، خراسان، قم، کرمانشاه و فارس وجود دارد (Hasanzadeh et al. 1993; Sahandpour and Ghasemi 2004). یکی از ویژگی‌های شگفت‌انگیز باکتری *E. amylovora* به‌رغم فواصل جغرافیایی و تفاوت‌های اقلیمی، هم‌گونی بسیار بالای این گونه بوده (Momol et al. 1997)، در نتیجه تشابه عمل باکتری در همه جا یکسان است. چندین مطالعه نشان داده است که جدایه‌های *E. amylovora* یک گروه بسیار یکنواخت و هموژن را تشکیل می‌دهند (Billing et al. 1961; Komagata et al. 1968; Paulin and Samson 1973). باکتری *E. amylovora* بر خلاف باکتری *Pseudomonas syringae* و *Xanthomonas campestris* یک گونه دارای تنوع نیست (Hirano and Upper 1990). هیچ گونه صفت مشخصه‌ای جهت تمایز جدایه‌های مختلف *E. amylovora* بر اساس منشأ جغرافیایی و یا میزبان و یا زمان‌های

مختلف پیدا نشده است (Vanneste 1995). بر اساس مطالعات گسترده در زمینه رده‌بندی جنس *Erwinia* و با استفاده از جدایه‌های متعلق به زیرخانواده دانه‌دارها، دای (Dye 1968) مشاهده کرد که تفاوت قابل توجهی در خصوصیات بیوشیمیایی یا مصرف کربوهیدرات‌های مختلف در بین اعضای گروه‌های مختلف باکتری *E. amylovora* پیدا نشد. بر اساس مطالعات سرولوژیک، الرود (Elrod 1941) چنین نتیجه‌گیری کرد که *E. amylovora* یک گونه شدیداً یکنواخت است. ۱۰۳ جدایه *E. amylovora* توسط Vantomme et al. (1982) بررسی شد و آن‌ها دریافتند که این جدایه‌ها از نظر بیوشیمیایی و خصوصیات الکتروفورز شیمیایی علی‌رغم تفاوتشان در منشأ جغرافیایی و میزبان، کاملاً یکنواختی نشان می‌دهند.

مطالعه ۲۲ جدایه از میزبان‌های مختلف با پراکنش جغرافیایی متفاوت، با استفاده از انگشت‌نگاری PCR، چندشکلی کمی را در ۱۷ جدایه نشان داد (Rico et al. 2003). بررسی ۹۳ جدایه باکتری *E. amylovora* با روش Rep-PCR و با استفاده از ۷ آغازگر تصادفی، چندشکلی بسیار کمی را تنها در ۱۱ جدایه نشان داد (Rico et al. 2008). با کمک شیوه‌های مولکولی، تنوع ژنتیکی جدایه‌های *E. amylovora* بهتر از قبل مشخص شده است. اولین کسی که تنوع در بیماری‌زایی باکتری *E. amylovora* را گزارش کرد آرثور (Arthur 1887) بود. دیگر مطالعات نیز نشان‌دهنده وجود تفاوت در جدایه‌های مختلف این باکتری است (Shaffer and Goodman 1962). برخی تفاوت‌ها بین جدایه‌های دانه‌دارها به‌وسیله آنالیز RAPD^۲ (Momol et al. 1997)، ریبوتایپینگ^۳ (McManus and Jones 1995) و الگوی PFGE^۴ (Zhang and Geider 1997) مشخص شده است.

برای مبارزه با این بیماری روش‌های کنترل متعددی به‌کار گرفته شده، ولی هیچ‌کدام از این روش‌ها به‌عنوان روش مبارزه قطعی مؤثر واقع نشده‌اند. یکی از عوامل محدود بودن موفقیت‌ها در زمینه مبارزه با این بیماری، شناخت محدود در زمینه تنوع ژنتیکی عامل بیماری آتشک می‌باشد. با گسترش هرچه بیشتر آتشک در

^۲ Random Amplified Polymorphic DNA

^۳ Ribotyping

^۴ Pulsed Field Gel Electrophoresis

^۱ Pomoidae

جدول ۱- فهرست جدایه‌های مختلف باکتری *E. amylovora*

کد شناسایی	گیاه میزبان	محل جمع‌آوری	سال جمع‌آوری
۱	گلابی	لرستان	۱۳۸۶
۲	گلابی	لرستان	۱۳۸۶
۹	سیب	لرستان	۱۳۸۶
۱۲/۱	گلابی	لرستان	۱۳۸۶
۱۲/۲	گلابی	سمنان	۱۳۸۶
۱۶	گلابی	قزوین	۱۳۸۶
۳۲	به	مرند	۱۳۸۶
۳۳	سیب	سمنان	۱۳۸۶
۳۳/۱	به	سمنان	۱۳۸۶
۳۶	سیب	مرند	۱۳۸۶
۴۷	سیب	لرستان	۱۳۸۶
۶۶	سیب	قزوین	۱۳۸۶
Ea273	سیب	ATCC	۱۳۸۴
K ₁	سیب	کرج (کمال شهر)	۱۳۸۴
K ₂	گلابی	کرج (کمال شهر)	۱۳۸۴
S ₁	سیب	شهریار	۱۳۸۴
Z ₁	سیب	زنجان (خرم دره)	۱۳۸۴
Z ₂	گلابی	زنجان (خرم دره)	۱۳۸۴

یافتن نقاطی با احتمال وجود تنوع بیش‌تر از جمله جداکننده‌های بین ژنی از سایت NCBI^۵ دریافت شد. با استفاده از نرم‌افزار FASTA توالی‌هایی که بالاترین درصد تشابه را با ژن‌های مورد نظر داشتند، جستجو شدند. سپس توالی‌های مذکور در نرم‌افزار MultAlin^۵ خطی شدند. با توجه به مشخص شدن نقاط حفاظت-شده و نقاطی که تفاوت بیش‌تری را نشان می‌دادند و نیز با در نظر گرفتن ویژگی‌های یک آغازگر ایده‌آل، اقدام به طراحی سه جفت آغازگر بر روی خوشه ژنی هارپین، یک جفت آغازگر روی خوشه ژنی *ams* و یک جفت آغازگر روی خوشه ژنی *dsp* شد.

استخراج DNA

به‌طور کلی از چهار روش جهت استخراج DNA استفاده شد. روش Zhou et al. (1996) و روش CTAB-SDS که به‌طور خلاصه شامل حذف ترکیبات دیواره سلولی و چربی‌های غشا با استفاده از دترجنت، حذف و هضم پروتئین‌های متصل به

مناطق مختلف پرورش سیب و گلابی در جهان و شدت بیماری در ارقام و پایه‌های حساس‌تر، نیاز برای شناخت بهتر تنوع ژنتیکی جدایه‌های *E. amylovora* از اهمیت بیشتری برخوردار می‌شود. همچنین به‌کارگیری پروتکل‌های قرنطینه‌ای آگاهانه به شناخت کامل تنوع در جدایه‌ها و تشخیص گروه‌های این جدایه‌ها بستگی دارد.

این تحقیق با هدف بررسی تنوع ژنتیکی موجود بین جدایه‌های باکتری عامل بیماری آتشک با به‌کارگیری نشانگر مولکولی PCR-RFLP و تعیین ارتباط بین منشأ مکانی و میزبانی و همچنین ارتباط شدت بیماری‌زایی با الگوی بانندی به‌دست آمده از این نشانگر در سه ناحیه ژنی *hrp*^۱، *ams*^۲ و *dsp*^۳ به‌عنوان نواحی اصلی ژنوم باکتری در بیماری‌زایی روی میزبان‌ها، طراحی و به‌انجام رسیده است.

مواد و روش‌ها

از بین ۱۸ جدایه فهرست شده در جدول ۱، ۱۷ جدایه از میزبان‌های آلوده نقاط مختلف کشور و جدایه Ea273 به‌عنوان جدایه استاندارد (خریداری شده از American Type Culture Collection) به‌صورت استوک‌های گلیسرول آماده، مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌ها در محیط کشت LB^۴ جامد کشت داده شده و به مدت ۷۲-۲۴ ساعت (بنا بر مدت زمان مناسب جهت رشد جدایه‌های مختلف)، در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. استخراج DNA با استفاده از روش (Zhou et al. 1996) تغییر یافته انجام شد. در این روش بر خلاف روش ذکر شده جهت استخراج افزودن SDS انجام نشد.

طراحی آغازگرهای اختصاصی روی کروموزوم اصلی باکتری طراحی این آغازگرها بر اساس توالی کامل کروموزومی *E. amylovora* جدایه ATCC 49946 بر روی سه خوشه ژنی *hrp*، *ams* و *dsp* انجام شد. علاوه بر توالی کامل کروموزومی، توالی‌های مربوط به ۴۵ ژن موجود در این سه خوشه ژنی، به‌منظور

¹ Harpin

² Amylovoran Synthase

³ Disease-Specific

⁴ Luria-Bertani Agar

⁵ National Center For Biotechnology Information

جدول ۲- اجزا واکنش PCR در ژنوم و پلاسمید pEA29

پلاسمید	ژنوم	اجزا واکنش PCR
۲ میکرولیتر	۲/۵ میکرولیتر	بافر PCR (۱۰ X)
۰/۳۵ میکرولیتر	۰/۷ میکرولیتر	MgCl ₂ (۵۰ میلی مولار)
۰/۵ میکرولیتر	۰/۵ میکرولیتر	dNTP (۱۰ میلی مولار)
۰/۹ میکرولیتر	۰/۵ میکرولیتر	آغازگر پیشرو (۱۰ پیکومول در میکرولیتر)
۰/۹ میکرولیتر	۰/۵ میکرولیتر	آغازگر پسرو (۱۰ پیکومول در میکرولیتر)
۱ میکرولیتر	۱ میکرولیتر	DNA الگو
۰/۳ میکرولیتر	۰/۲ میکرولیتر	Taq DNA polymerase (۵ یونیت در میکرولیتر)

هضم محصولات PCR با آنزیم‌های اندونوکلاز انجام شد. آنزیم‌های مناسب جهت ایجاد برش در توالی‌های تکثیر شده مورد نظر (*TaqI* و *Sall*, *PstI*, *MboI*, *HhaI*, *BglII*, *AluI*) از طریق نرم‌افزار RestrictionMapper تعیین شدند. هضم آنزیمی بر روی مخلوطی با حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر محصولات PCR، یک میکرولیتر بافر آنزیم، یک میکرولیتر (۱۰ یونیت) از آنزیم مورد نظر و ۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل و نگهداری به مدت ۱۶ ساعت در دمای مناسب فعالیت آنزیم، صورت گرفت. پس از هضم محصولات PCR، جداسازی محصولات هضم شده همانند محصولات PCR، لیکن روی ژل آگارز دو درصد انجام شد.

توالی‌یابی

از بین محصولات PCR به دست آمده از هر ۵ جفت آغازگر طراحی شده، ۵ محصول به دست آمده حاصل از تکثیر خوشه‌زنی *ams* با آغازگر AMSD با پراکندگی جغرافیایی مختلف مربوط به جدایه‌های ۱۲/۱ از استان لرستان، ۳۶ از مرند، Ea273 از آمریکا، K₁ از کرج (کمال شهر) و Z₁ از زنجان (خرم دره)، جهت توالی‌یابی انتخاب شدند. به این منظور، میزان ۴۰ میکرولیتر از محصولات PCR هر یک از جدایه‌های مذکور، آماده سازی شده و از طریق شرکت امینسان به شرکت Bio Basic کانادا فرستاده شده و توسط روش سنگر با استفاده از دو آغازگر پیشرو و پسرو، مورد توالی‌یابی دو طرفه قرار گرفتند. بررسی نتایج با استفاده از نرم افزارهای MultAlin و Chromas انجام شد.

بررسی تنوع ژنتیکی پلاسمید pEA 29

DNA و سایر ترکیبات پروتئینی، حذف و هضم RNA و شستشو، رسوب و انعقاد DNA خالص شده و رقیق سازی بود. روش جوشاندن شامل تهیه سوسپانسیون از باکتری و حرارت دادن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و روش جوشاندن با NaOH شامل تهیه سوسپانسیون از باکتری و حرارت دادن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با NaOH دارای غلظت ۰/۰۵ مولار بود.

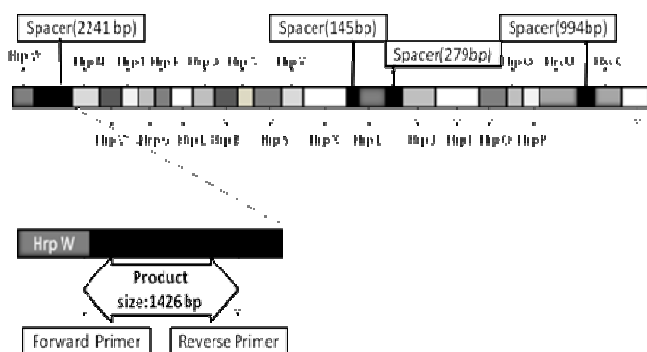
PCR-RFLP

پس از انجام واکنش PCR گرادیان دمایی جهت دستیابی به دمای اتصال بهینه برای هر جفت از آغازگرها (شکل ۷) (جدول ۳)، PCR-RFLP، شامل تکثیر قطعات DNA بین دو آغازگر پیشرو و پسرو و سپس هضم محصولات با آنزیم‌های اندونوکلاز انجام شد. هر یک واکنش PCR برای هر جدایه طبق جدول ۲ در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. واکنش تکثیر طبق جدول ۳ به تعداد ۳۵ سیکل انجام شد. باندهای حاصل از واکنش PCR از طریق انجام الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱/۲ درصد حرکت داده شده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید با غلظت یک مایکروگرم در میلی‌لیتر با استفاده از نور فرابنفش آشکارسازی شدند.

جدول ۳- سیکل‌های حرارتی واکنش PCR بر روی DNA ژنومی

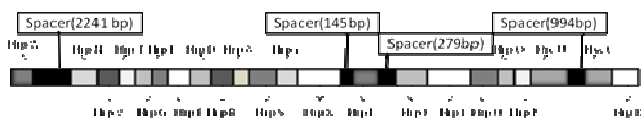
مراحل واکنش PCR	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)
واسرشت اولیه	۹۴	۵
واسرشت سازی	۹۴	۱
اتصال	دمای مناسب به دست آمده از PCR گرادیان دمایی	۱
توسعه	۷۲	۱
توسعه نهایی	۷۲	۱۰

آغازگرهای خوشه‌های ژنی *hrp*، *ams* و *dsp* طبق جدول ۴، سه جفت آغازگر بر روی خوشه ژنی *hrp* طراحی شد. در جفت آغازگر اول، آغازگر پیشرو در داخل ژن *hrpW* و آغازگر پسرو روی جداکننده میان دو ژن *hrpW* و *hrpN* قرار داشت. طول قطعه‌ای که انتظار می‌رفت در فاصله بین دو آغازگر تکثیر شود، ۱۴۲۶ جفت باز بود (شکل ۲).



شکل ۲- خوشه ژنی *hrp* از باکتری *E. amylovora* و موقعیت جفت آغازگر HRPW بر روی این خوشه ژنی

در جفت دوم، آغازگر پیشرو روی جداکننده بین دو ژن *hrpX* و *hrpL* و آغازگر پسرو روی جداکننده بین دو ژن *hrpL* و *hrpJ* طراحی شد، به‌طوری که فاصله بین دو آغازگر، ۸۸۶ جفت باز بود (شکل ۳) (جدول ۴).



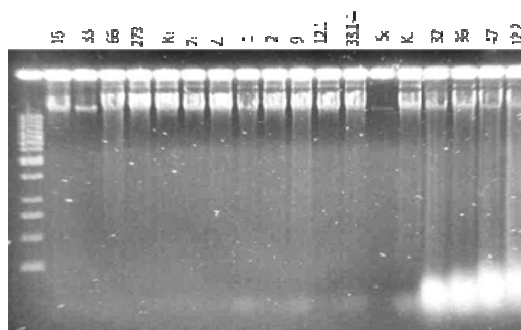
شکل ۳- خوشه ژنی *hrp* از باکتری *E. amylovora* و موقعیت جفت آغازگر HRPL بر روی این خوشه ژنی

بررسی تنوع ژنتیکی در بخشی از پلاسمید pEA29 به‌وسیله جفت آغازگر PEANT1 (5'-TATCCCTAAAAACCTCAGTGC-) و PEANT2 (3'-GCAACCTTGTCCTTTA-5') (Liop et al. 2000) انجام شد. هر واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر طبق جدول ۲ انجام شد. واکنش تکثیر به تعداد ۳۵ سیکل مشابه سیکل‌های حرارتی واکنش PCR بر روی ژنوم، با دمای اتصال ۵۶ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. بررسی باندهای حاصل با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد انجام شد. در نهایت جدایه‌های یک و ۹ از استان لرستان و جدایه Ea273 از آمریکا برگزیده و جهت توالی‌یابی ارسال شدند.

نتایج و بحث

استخراج DNA

از بین روش‌های انجام شده جهت استخراج DNA، روش‌های استخراج شده به روش جوشاندن با NaOH، آلودگی‌های زیادی داشته و در نتیجه محصولات PCR حاصل از آن نیز از کیفیت خوبی برخوردار نبودند. از طرفی در روش CTAB-SDS نیز با وجود تکرار زیاد، DNAهای حاصل از نظر کمیت ناچیز بودند. با توجه به نتایج بهتر حاصل در روش Zhou et al. (1996) به عنوان روش مناسب استخراج DNA انتخاب شد. استفاده از این روش علی‌رغم وجود مقداری آلودگی پروتئینی (شکل ۱) مانع از اتصال مطلوب آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده به DNA باکتری نشد. پس از کشت جدایه‌های مورد بررسی (جدول ۱) و استخراج DNA جدایه‌ها، تمامی DNAهای استخراجی به نسبت ۱ به ۴۰ رقیق شده و در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

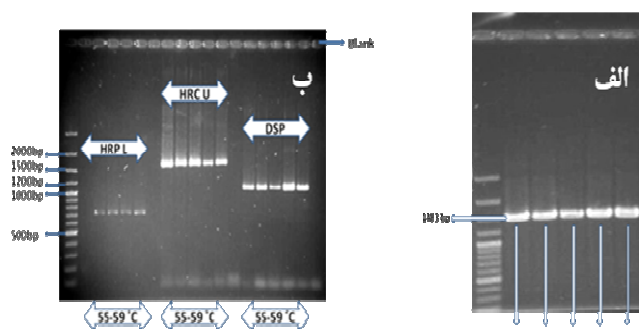


شکل ۱- DNAهای استخراج شده از جدایه‌های مختلف باکتری *E. amylovora*

به منظور دستیابی به دمای اتصال بهینه جهت واکنش PCR برای هر جفت از آغازگرهای مورد بررسی، از روش گرادیان دمایی استفاده شد. با توجه به کیفیت باندهای حاصل از دماهای در نظر گرفته شده، دمای بهینه اتصال جهت آغازگرهای AMSD (شکل ۷-الف)، HRPL، HRCU و DSP (شکل ۷-ب) به ترتیب ۵۷، ۵۹ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. جهت جفت آغازگر HRPW، بدون استفاده از گرادیان دمایی، با انجام چند واکنش جداگانه با دماهای اتصال متفاوت، دمای ۵۱ درجه سانتی-گراد انتخاب شد.



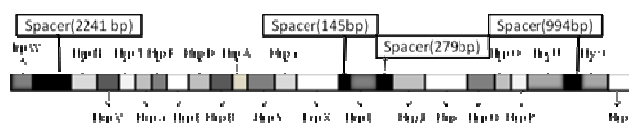
شکل ۶- خوشه ژنی *ams* از باکتری *E. amylovora* و موقعیت جفت آغازگر AMSD بر روی این خوشه ژنی



شکل ۷- PCR گردایان دمایی جهت آغازگر AMSD بر روی جدایه ۳۲ (الف) و آغازگرهای HRPL، HRCU و DSP به ترتیب بر روی جدایه‌های ۳۳/۱، ۳۳/۲ و ۳۳/۳ (ب)

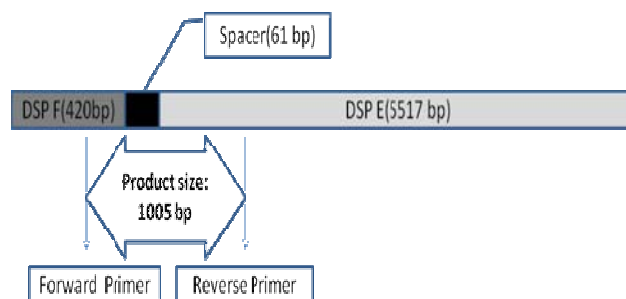
بررسی تنوع ژنتیکی در خوشه‌های ژنی *hrp*، *ams* و *dsp* بر اساس نتایج حاصل از انجام واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای پیشرو و پسرو HRPW، HRPL و HRCU، هر ۱۸

در جفت آغازگر سوم، آغازگر پیشرو در داخل ژن *hrcU* و آغازگر پسرو در داخل ژن *hsvC* بود. فاصله بین دو آغازگر در برگرفته یک جداکننده، طبق جدول ۴، قطعه‌ای ۱۵۵۵ جفت بازی بود (شکل ۴).



شکل ۴- خوشه ژنی *hrp* از باکتری *E. amylovora* و موقعیت جفت آغازگر HRCU بر روی این خوشه ژنی

در جفت آغازگر طراحی شده روی خوشه ژنی *dsp*، آغازگر پیشرو داخل ژن *dspF* و آغازگر پسرو در داخل ژن *dspE* قرار داشت. فاصله آغازگرها شامل بخشی از دو ژن *dspF* و *dspE* به همراه جداکننده، ۱۰۰۵ جفت باز بود (جدول ۴) (شکا ۵).

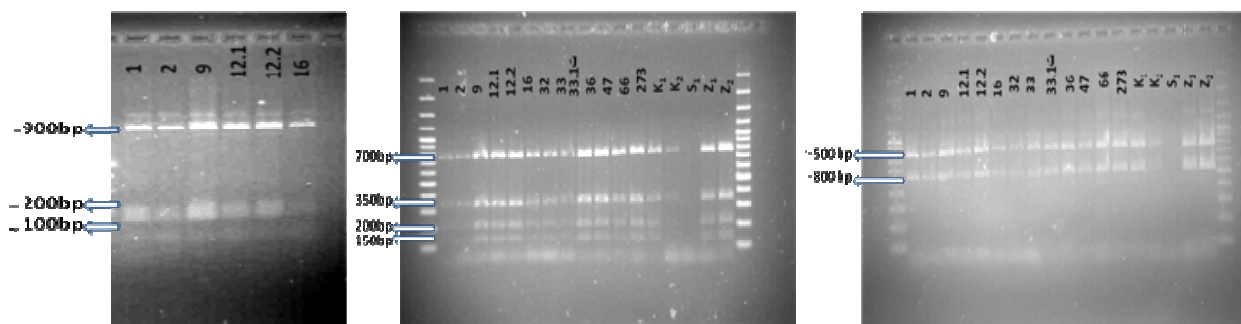


شکل ۵- خوشه ژنی *dsp* از باکتری *E. amylovora* و موقعیت جفت آغازگر DSP بر روی این خوشه ژنی

در یک جفت آغازگر طراحی شده روی خوشه ژنی *ams*، آغازگر پیشرو در داخل ژن *amsD* و آغازگر پسرو در داخل ژن *amsB* قرار داشت. اندازه قطعه تکثیری بین دو آغازگر، دربرگیرنده بخشی از ژن *amsD* و *amsB* و تمام ژن *amsC* به همراه دو جداکننده، ۱۴۸۳ جفت باز بود (جدول ۴) (شکل ۶).

جدول ۴- آغازگرهای طراحی شده جهت بررسی تنوع ژنتیکی روی DNA ژنومی

نام آغازگر	توالی آغازگر	طول آغازگر (جفت باز)	طول قطعه تکثیری (جفت باز)	دمای اتصال
HRPW F	5'-CTGAAGGTGGCTGAATGAT-3'	۱۹	۱۴۲۶	۵۶ °C
HRPW R	5'-TATGGCACTATCTCGTCAG-3'	۱۹		۵۶ °C
HRPL F	5'-CATTGAGGCAGTGTCCAGA-3'	۱۹	۸۸۶	۵۸ °C
HRPL R	5'-GAGCAGTTGTCATTGTGTGG-3'	۲۰		۶۰ °C
HRCU F	5'-GCTGCTGACATTGCTGGTA-3'	۱۹	۱۵۵۵	۵۸ °C
HRCU R	5'-TGAAACGGATAGTGGAGGAG-3'	۲۰		۶۰ °C
DSP F	5'-CGTTGTGCAGTTCATCCAG-3'	۱۹	۱۰۰۵	۵۸ °C
DSP R	5'-AGATGTCGTCGGTGATGAAC-3'	۲۰		۶۰ °C
AMSD F	5'-CGACAGGGTAGTAAGGTTCA-3'	۲۰	۱۴۸۳	۶۰ °C
AMSD R	5'-ACAGGAAAGTAGCGGTCGAG-3'	۲۰		۶۲ °C



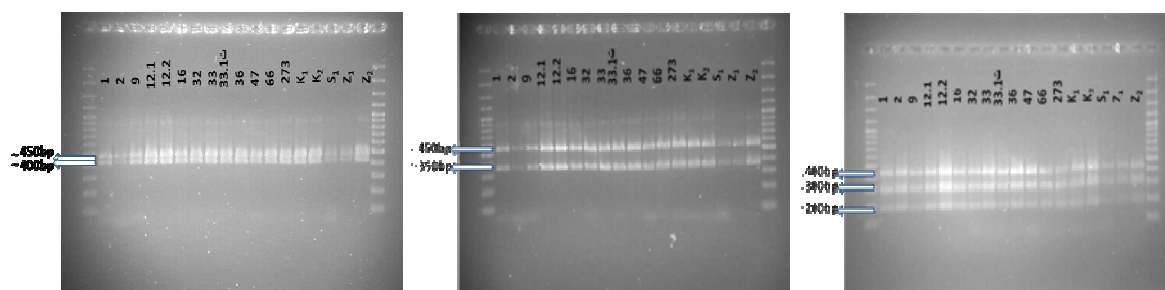
شکل ۸- اثر آنزیم‌های به ترتیب از راست *Pst*I، *Taq*I و *Mbo*I بر روی قطعه تکثیری با جفت آغازگر HRPW (اعداد درون شکل، نام جدایه‌های باکتری است)

به طول باندهای کم‌تر از ۲۰۰، ۳۰۰ و حدود ۴۰۰ جفت باز، آنزیم *Pst*I، دو قطعه به طول باندهای ۳۵۰ و ۴۵۰ جفت باز و آنزیم *Bgl*III دو قطعه با طول باندهای نزدیک به هم در حدود ۴۰۰ و ۴۵۰ جفت باز بود. در این قطعه نیز تنوعی در باندهای حاصل از هضم آنزیمی مشاهده نشد (شکل ۹).

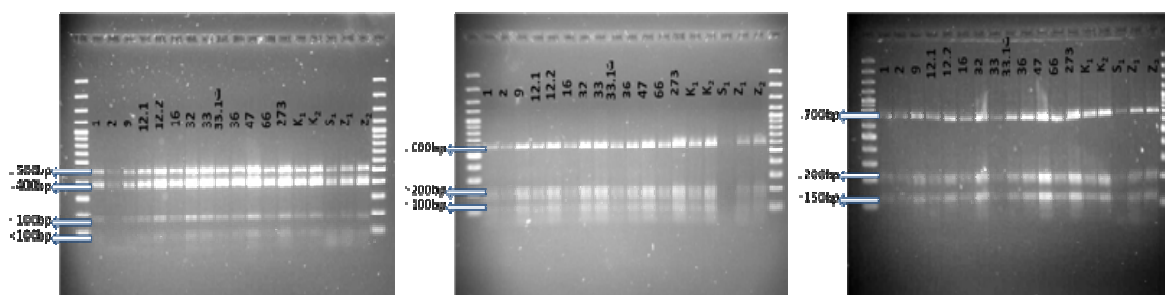
آنزیم‌های *Mbo*I، *Alu*I و *Taq*I، آنزیم‌های اثرگذار بر روی قطعه تکثیری توسط آغازگرهای HRCU به طول ۱۵۵۵ جفت باز بودند. از اثر آنزیم *Mbo*I بر روی قطعه مذکور به طور واضح سه باند با طول تقریبی ۱۵۰، ۲۰۰ و ۷۰۰ جفت باز، *Alu*I سه باند با حدوداً ۱۰۰، ۲۰۰ و ۶۰۰ جفت باز و *Taq*I با چهار باند به طول کم‌تر از ۱۰۰، ۱۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ جفت باز ایجاد شدند. در خصوص

جدایه، علاوه بر دارا بودن باند، دارای طول باند یکسان بودند. به عبارت دیگر هیچ‌گونه تنوعی در محل اتصال آغازگرهای مذکور به DNA الگو وجود نداشت. آنزیم‌های منتخب جهت هضم قطعه ۱۴۲۶ جفت بازی حاصل از جفت آغازگر HRPW، *Pst*I، *Taq*I و *Mbo*I بودند. در اثر هضم با آنزیم *Pst*I، دو باند به اندازه‌های حدود ۵۰۰ و ۸۰۰ جفت باز، آنزیم *Taq*I، ۴ باند به اندازه‌های ۱۵۰، ۲۰۰، ۳۵۰ و ۷۰۰ جفت باز و آنزیم *Mbo*I شامل یک قطعه به طور واضح ۹۰۰ جفت بازی بود (شکل ۸).

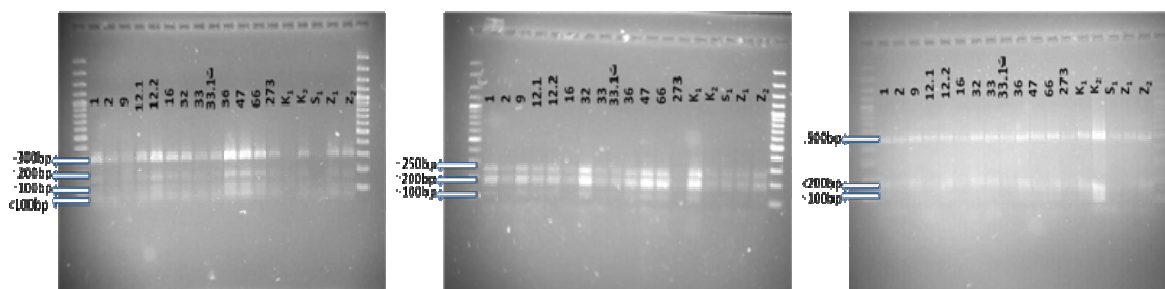
آنزیم‌های اثرگذار بر روی قطعه تکثیری توسط آغازگرهای HRPLF و HRPLR به طول ۸۸۶ جفت باز، *Mbo*I، *Pst*I و *Bgl*III بودند. بر اساس نتایج حاصل از هضم با آنزیم *Mbo*I، سه قطعه



شکل ۹- اثر آنزیم‌های به‌ترتیب از راست *MboI*، *PstI* و *BglIII* بر روی قطعه تکثیری با جفت آغازگر HRPL



شکل ۱۰- اثر آنزیم‌های به‌ترتیب از راست *MboI*، *AluI* و *TaqI* بر روی قطعه تکثیری با جفت آغازگر HRCU



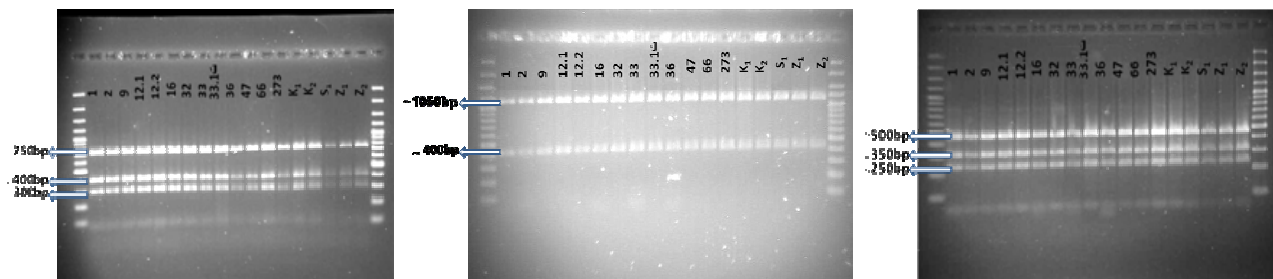
شکل ۱۱- اثر آنزیم‌های به‌ترتیب از راست *MboI*، *HhaI* و *AluI* بر روی قطعه تکثیری با جفت آغازگر DSP

و ۳۰۰ جفت باز حاصل شد. در این مورد نیز تنوعی در باندهای حاصل از برش آنزیمی و نیز تولید محصولات PCR در هیچ‌یک از جدایه‌ها مشاهده نشد (شکل ۱۱).

قطعه ۱۴۸۳ جفت بازی حاصل از جفت آغازگر AMSD، توسط سه آنزیم *MboI*، *SalI* و *TaqI* مورد هضم قرار گرفت. هضم با آنزیم *MboI* سه باند به‌طول ۲۵۰، حدود ۳۵۰ و تقریباً ۵۰۰ جفت باز، آنزیم *SalI* دو باند به‌طول حدود ۴۰۰ و ۱۰۵۰ جفت باز، آنزیم *TaqI*، سه باند به‌طول ۳۰۰، ۴۰۰ و ۷۵۰ جفت باز ایجاد

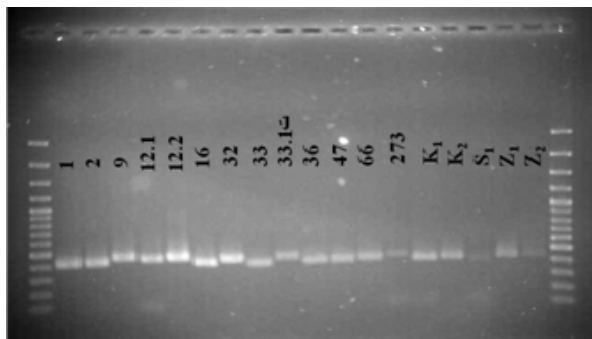
استفاده از این جفت آغازگر نیز یکنواختی چه در طول قطعات حاصل از PCR و چه در طول باندهای حاصل از هضم آنزیمی در هر ۱۸ جدایه مورد بررسی مشاهده شد (شکل ۱۰).

تولید محصولات PCR با جفت آغازگر DSP، تنوعی را در طول باندهای حاصل نشان نداد. در اثر هضم کامل آنزیم *MboI* در قطعه ۱۰۰۵ جفت بازی حاصل، سه باند با طول‌های ۱۰۰، کم‌تر از ۲۰۰ و ۵۰۰ جفت باز، آنزیم *HhaI* سه باند به‌طول ۱۰۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ جفت باز و *AluI* چهار باند با طول کم‌تر از ۱۰۰، ۱۰۰، ۲۰۰



شکل ۱۲- اثر آنزیم‌های به‌ترتیب از راست *MboI*، *Sall* و *TaqI* بر روی قطعه تکثیری با جفت آغازگر AMSD

قرار گرفتند. مقایسه این سه توالی با وجود تشابه در یک بخش ۳۶۹ جفت بازی، در بخش 5'→3' تنوعی را نشان داد (شکل ۱۴).



شکل ۱۳- انجام واکنش PCR با آغازگرهای PEANT1 و PEANT2 بر روی پلاسمید pEA29

نواحی بین‌ژنی در ژنوم پروکاریوت‌ها، ژن‌های به‌طور معمول تک نسخه‌ای را از یکدیگر تفکیک نموده و به‌عنوان مراکز تنوع پروکاریوت‌ها در نظر گرفته می‌شوند. این نواحی می‌توانند تنوع بیش‌تری را نسبت به نواحی کد کننده پروتئین‌ها از خود بروز دهند. بنابراین تمام آغازگرهای طراحی شده جهت بررسی تنوع، پوشش دهنده نواحی بین ژنی در سه خوشه ژنی *ams*، *hrp* و *dsp* بودند. با این وجود، تکثیر قطعات بین آغازگرهای پیشرو و پسرو و پس از آن هضم آنزیمی، در هیچ یک از نواحی مورد بررسی، تنوعی را نشان نداد. این نتیجه با نتایج حاصل از کاربرد نشانگر PCR-RFLP روی ژن *amsB* با استفاده از دو آغازگر AMSbL و AMSbR با حصول الگوی بانندی یکسان در ۱۴ جدایه مختلف در لهستان مطابقت دارد (Pulawska et al. 2006). آنالیز ناحیه 3' از ژن *hrpN* در جدایه‌های باکتری با دامنه میزبانی مختلف نشان داد

نمودند. یکنواختی ۴ جفت آغازگر دیگر در محصولات حاصل از هضم کامل آنزیمی، در خصوص این جفت آغازگر نیز صادق بود (شکل ۱۲).

به‌منظور اطمینان از صحت نتایج نشانگر PCR-RFLP، از توالی-یابی ۵ محصول به‌دست آمده از آغازگر AMSD، مربوط به جدایه‌هایی دارای پراکنش جغرافیایی شامل Ea273 (جدایه استاندارد)، ۱۲/۱، ۳۶، K₁ و Z₁ که به‌ترتیب متعلق به استان‌های لرستان، آذربایجان شرقی (مرند)، کرج (کمال‌شهر) و زنجان (خرم‌دره) استفاده شد و نتایج آن نشان داد که هیچ‌گونه تفاوت و تنوعی حتی در سطح تک‌نوکلئوتید وجود نداشته و توالی‌های موردنظر به‌طور کامل مشابه بودند. توالی‌های مذکور (به استثناء جدایه Ea273) از طریق Bankit ارسال شده و در سایت NCBI به‌ترتیب با کدهای JQ665841، JQ619719، JX262069 و JX277551 ثبت شدند.

تنوع ژنتیکی در پلاسمید pEA29 بنابر نتایج حاصل از انجام واکنش PCR با آغازگرهای PEANT1 و PEANT2 (شکل ۱۳)، جدایه‌های مورد بررسی بر اساس تفاوت در طول باندهای خود در سه گروه قرار گرفتند. کوتاه‌ترین طول باند، مربوط به جدایه‌های ۱، ۲، ۱۶، ۳۳ و ۳۶، بلندترین طول باند، مربوط به جدایه‌های ۱/۳۳، Ea273، K₁، K₂، Z₁ و Z₂ و جدایه‌های ۹، ۱۲/۱، ۱۲/۲، ۳۲، ۴۷ و S₁ دارای طول باند مابین دو گروه بودند. طول باندهای حاصل از حدود ۳۸۰ تا ۴۲۰ جفت باز متغیر بود. بر این اساس جدایه‌های ۱ و ۹ از استان لرستان و جدایه Ea273 از آمریکا به‌عنوان نمونه‌ای از سه گروه بانندی انتخاب و با استفاده از آغازگر پسرو PEANT2 مورد توالی‌یابی

1	100
Seq1	CCCTTAAT CCGG----- ---ATTACAG AATTACAGAA TTACAGAATT ACAGAATTAC AGAATTATCA AACAGGCTGC
seq9	CCGTATAAG AATTACAGAT TACAGAATT CAG-AATTAC AGAATTACAG AATTACAGAA TTACAGAATT ACAGAATTAC AGAATTATCA AACAGGCTGC
seq273	CCCTTAT TAAGGAATTA CAGGAATTAC AGAATTACAG AATTACAGAA TTACAGAATT ACAGAATTAC AGAATTATCA AACAGGCTGC
Nebi	TATCCCTAAA AACCTCAGTG CG----- ---ATTACAG AATTACAGAA TTACAGAATT ACAGAATTAC AGAATTATCA AACAGGCTGC
Consensus	c...a...acc.ca.t...Cggg..... ---ATTACAG AATTACAGAA TTACAGAATT ACAGAATTAC AGAATTATCA AACAGGCTGC

شکل ۱۴- نتایج حاصل از مقایسه توالی‌یابی حاصل از جفت آغازگر PEANT و مشاهده تنوع در بخش 3'→5'

مختلف ایران، هیچ‌گونه تنوعی بین این جدایه‌ها در مقایسه با جدایه استاندارد Ea273، به‌دست نیامد. به‌نظر می‌رسد حفاظت-شدگی بالای ژن‌های مذکور در جدایه‌های مختلف این باکتری به-رغم تفاوت‌های اقلیمی، فواصل جغرافیایی و میزبان، جهت حفظ قدرت بیماری‌زایی ضروری می‌باشد. سایر آغازگرها مورد استفاده در ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوم باکتری در نواحی بین ژنی خوشه-های *ams*، *hrp* و *dsp* که طراحی شده و هیچ‌گونه تنوعی حتی در یک نوکلئوتید مشاهده نشد. به علاوه نتایج توالی‌یابی جدایه‌هایی با فواصل بسیار زیاد جغرافیایی نیز کاملاً یکسان بود. ظاهراً وجود چنین حفاظت‌شدگی بالایی از مکانیزم DNA repair توانمند این باکتری منشا می‌گیرد.

نقش پلاسمید pEA29 در باکتری *E. amylovora* هنوز ناشناخته است هرچند که در بیوسنتز تیامین در این باکتری نقش دارد (Sundin et al. 2004). مطالعه بر روی جدایه‌ای فاقد این پلاسمید نشان داد که سطح بیماری‌زایی این جدایه مشابه جدایه‌های دیگر دارای آن می‌باشد (Liop et al. 2006). قطعات برشی پلاسمید با *PstI* در برخی از جدایه‌ها طولی بیش‌تر از اندازه مورد انتظار را نشان می‌دهد (McManus and Jones 1995). این تفاوت در طول، به‌دلیل حضور تعداد متفاوتی از قطعات کوتاه تکراری می-باشد (Schnabel and Jones 1998). در تحقیق حاضر بررسی بخش کوچکی از پلاسمید pEA29 در این جدایه‌ها، تنوعی را در سمت آغازگر پیشرو (PEANT1) نشان داد. چنان‌که بر اساس مطالعات McGhee et al. (2001) طول این پلاسمید از ۲۷/۷ تا ۳۵ کیلوباز بنابر حذف و یا درج شدن، متغیر می‌باشد. همچنین آنالیزهای RFLP با استفاده از آنزیم‌های *MspI* و *Sau3A* تنوعی را در این پلاسمید نشان داد (Barionovi et al. 2006). نتایج این بررسی تایید کننده وجود تنوع در این پلاسمید است. بر اساس

که در جدایه‌های معمول میزبان‌های درختان میوه دانه‌دار تنوعی در این ناحیه وجود ندارد. مقایسه جدایه‌های درختان میوه دانه‌دار با دو فرم اختصاصی باکتری جدا شده از جنس *Rubus* و *Amelanchier* تنوعی را بین این دو گروه جدایه نشان داد، به-گونه‌ای که محصول PCR مربوط به چهار جدایه از آن‌ها، ۶۰ جفت باز کوتاه‌تر از سایر جدایه‌ها بودند (Giorgi and Scortichini 2005). در آنالیزهای RFLP انجام شده روی این جدایه‌ها نیز بروز یک جهش نقطه‌ای خاموش در جایگاه برش آنزیم *RsaI* منجر به تمایز تنها یک جدایه‌ی جداسازی شده از جنس *Rubus*، از سایرین شد. همچنین توالی‌یابی پروموتورهای ژن‌های *dspA/E* و *hrpW* در چهار جدایه از دو میزبان مذکور، در مقایسه با جدایه *E. amylovora* CFBP1430 به‌ترتیب یک و دو جهش نقطه‌ای را نشان داد، در حالی‌که در یک ناحیه ۶۱۳ جفت بازی از ژن *dspA/E* در ۷ جدایه از میزبان‌های مختلف دیگر، با پراکنش جغرافیایی، جهشی مشاهده نشد. این نتایج مؤید وجود یکنواختی بالا در جدایه‌های معمولی باکتری *E. amylovora* است. با وجود سطح پایین تنوع ژنتیکی در جدایه‌های مختلف این باکتری، تفاوت‌های مشخصی مابین ژنوم جدایه‌های جمع-آوری شده از دو میزبان سبب و *Rubus* وجود دارد که جدایه‌های نوع دوم در گروه مستقلی از جدایه‌های درختان میوه دانه‌دار طبقه‌بندی شده‌اند (Powney et al. 2011). در تحقیق حاضر برخی از آغازگرها نظیر HRPWR و HRPLF، در داخل نواحی جداکننده طراحی شده بودند تا در صورت وجود تنوع، آغازگرها به DNA متصل نشده و قطعه‌ای تکثیر نگردد. با این وجود در انجام واکنش PCR، تمام قطعات بین دو آغازگر برای هر ۱۸ جدایه مورد بررسی دارای محصول یکنواخت بودند. علاوه بر عدم مشاهده تنوع ژنتیکی در جدایه‌های بومی میزبان‌های نقاط

رابطه با شدت بیماری‌زایی و وجود این پلاسمید در باکتری مورد گزارش قرار گرفت. بر اساس یافته‌های این تحقیق و گزارشات اخیر انجام گرفته در زمینه وجود پلاسمیدهای دیگر در این گونه، لازم است در بررسی‌های جامع‌تری نسبت به ارزیابی وجود و عدم وجود این پلاسمیدها و همچنین بررسی تنوع ژنتیکی آن‌ها اقدام کرد.

وجود برخی ژن‌های تحمل به شرایط نامساعد محیطی بر روی پلاسمیدهای باکتری، این احتمال وجود دارد که بخشی از تفاوت در بیماری‌زایی باکتری از وجود یا عدم وجود پلاسمیدهای مختلف و تنوع ژن‌های موجود بر روی آن‌ها منشاء گیرد. اخیراً (Liop et al. 2011) وجود پلاسمید جدید pEI70 را در باکتری *E. amylovora* گزارش نمود. در این بررسی همچنین تفاوتی در

منابع

Arthur JC (1887) History and biology of pear blight. In: Proceedings of the Philadelphia Academy of Natural Sciences. USA Cornell university 322-341.

Barionovi D, Giorgi S, Stoeger AR, Ruppitsch W, Scortichini M (2006) Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different host plants using repetitive-sequences PCR analysis, and restriction fragment length polymorphism and short-sequence DNA repeats of plasmid pEA29. Journal of Applied Microbiology 100: 1084-1094.

Billing E, Baker LAE, Crosse JE, Garret CME (1961) Characteristics of English isolates of *Erwinia amylovora* (Burrill). Journal of Applied Bacteriology 24: 195-211.

Duffy B, Schärer HJ, Bünter M, Klay A, Holliger E (2005) Regulatory measures against *Erwinia amylovora* in Switzerland EPPOBull 35:239-244.

Dye DW (1968) A taxonomic study of the genus *Erwinia*. The 'amylovora' group. New Zealand Journal of Sciences 11: 590-607.

Elrod RP (1941) Serological studies of the *Erwinia*. *Erwinia amylovora*. Botanical Gazette 103:123-131.

Giorgi S, Scortichini M (2005). Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different host plants through RFLP analysis and sequencing of *hrp N* and *DSP A/E* genes. Plant Pathology 54:789-798.

Hasanzadeh N, Zakeri Z, Mazarei M (1993) The status of fire blight disease in Iran. In: Proceedings of 11th Iranian plant protection congress Rasht Iran 223 (In Farsi).

Hirano SS, Upper CD (1990) Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. Annual Review of Phytopathology 28: 155-177.

Komagata K, Tamagawa Y, Kocur M (1968) Differentiation of *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora* and *Erwinia herbicola*. Journal of General Applied Microbiology 14: 39-45.

Llop P, Bonaterra AJ, Penalver, Lopez MM (2000) Development of a highly sensitive Nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. Applied and Environmental Microbiology 66: 2071-2078.

Llop P, Donat V, Rodriguez M, Cabrefiga J, Ruz L, Palomo JL, Montesinos E, Lopez MM (2006) An Indigenous Virulent Strain of *Erwinia amylovora* Lacking

the Ubiquitous Plasmid pEA29. Phytopathology 96: 900-907.

Llop P, Cabrefiga J, Smits THM, Dreo T, Barbe S, Pulawska J, Bultreys A, Blom J, Duffy B, Montesinos E, Lopez MM (2011) *Erwinia amylovora* Novel Plasmid pEI70: Complete Sequence, Biogeography, and Role in Aggressiveness in the Fire Blight Phytopathogen. PLoS ONE 6-e28651:1-10.

McGhee GC, Foster GC, Jones AL (2001) Genetic diversity among *Erwinia amylovora*'s ubiquitous plasmid pEA29. Acta Horticulturae 590: 413-421.

McManus PS, Jones AL (1995) Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR dot-blot and reverseblothybridizations. Plant Disease 85: 618-623.

Momol MT, Momol EA, Lamboy WF, Norelli JL, Beer SV, Aldwinckle HS (1997) Characterization of *Erwinia amylovora* strains using Random Amplified Polymorphic DNA fragments (RAPDs). Journal of Applied Microbiology 82: 389-398.

Norelli JL, Jones AL, Aldwinckle HS (2003) Fire Blight management in the twenty- first century: using new technologies that enhance host resistance in apple. Plant Disease 87: 756-765.

Paulin JP, Samson R (1973) Le feu bactérien en France. II. Caractères des souches d'*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. 1920, isolées du Foyer Franco-Belge. Annales de Phytopathologie 5: 389-397.

Powney R, Smits THM, Sawbridge T, Frey B, Blom J, Frey JE, plummer KM, Beer SV, Luck J, Duffy B, Rodoni B (2011) Genome sequence of an *Erwinia amylovora* strain with pathogenicity restricted to *Rubus* plants. Journal of Bacteriology 193: 785-786.

Pulawska J, Kielak K, Sobiczewski P (2006) Phenotypic and Genetic diversity of selected *Erwinia amylovora* strains from Poland. Acta Horticulturae 704:439-444.

Rico A, Ortiz-Barredo A, Ritter E, Murillo J (2003) Genetic characterization of *Erwinia amylovora* strains by amplified fragment length polymorphism. Journal of Applied Microbiology 96: 302-310.

Rico A, Führer ME, Ortiz-Barredo A, Murillo J (2008) Polymerase Chain Reaction Fingerprinting of *Erwinia amylovora* has a Limited Phylogenetic Value but Allows the Design of Highly Specific Molecular Markers. Phytopathology 98: 260-269.

Sahandpoor A, Ghasemi A (2004) Occurrence of pome fruit fire blight disease in Fars. In: Proceedings of 16th Iranian plant protection congress Tabriz, Iran. (In Farsi).
 Schnabel EL, Jones AL (1998) Instability of a pEA29 marker in *Erwinia amylovora* previously used for strain classification. Plant Disease 82: 1334-1336.
 Shaffer WH, Goodman RN (1962) Progression *in vivo*, rate of growth *in vitro*, and resistance to streptomycin, as indices of virulence of *Erwinia amylovora*. Phytopathology 52: 1201-1207.
 Shitberg D, Oppenheim D, Herzog Z, Zilberstaine M, Kritzman G (2000) Fire Blight of Pears in Israel: infection, Prevalence, Intensity and efficacy of management actions. Phytoparasitica 28:361-374.
 Sundin GW, McGhee GC, Foster GC, Jones AL (2004). Genetic analysis of the ubiquitous plasmid pEA29 and two new *Erwinia amylovora* plasmids. Acta Horticulturae 704:423-430.
 van der Zwet T, Bonn WG (1999) Recent spread and current worldwide distribution of Fire blight. Acta Horticulturae 489:167-168.

Vanneste JL (1995) Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases: Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases Vol 1, Prokaryotes Pergamon Press Oxford London 21-41.
 Vantomme R, Swings J, Goor M, Kersters K, De Ley J (1982) Phytopathological, serological, biochemical and protein electrophoretic characterization of *Erwinia amylovora* strains isolated in Belgium. Phytopathologische Zeitschrift 103:349-360.
 Zakeri Z, Sharifnabi B (1991) Fire blight disease in Karaj In: Proceedings of 10th Iranian plant protection congress Kerman, Iran (In Farsi).
 Zhang Y, Geider K (1997) Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by pulsedfield gel electrophoresis Applied Environmental Microbiology 63: 4421-4426.
 Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. Applied and Environmental Microbiology 62: 316-322.