

Ф.И. Товкач, С.Н. Мороз, Н.А. Король, Ю.В. Файдюк, А.И. Кушкина

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП Д03680, Украина*

ПОЛИВАЛЕНТНОСТЬ БАКТЕРИОФАГОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ПЛОДОВЫХ ДЕРЕВЬЕВ, ПОРАЖЕННЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫМ ОЖОГОМ

*Обнаружены и описаны фаговые популяции, которые появляются вследствие патологического процесса, обусловленного *Erwinia amylovora*, и сопровождают развитие ожога при вегетации айвы, груши и яблони в Закарпатском регионе Украины. Фаговые изоляты из пораженных айвы и груши содержат разные поливалентные вирулентные фаги, которые способны размножаться на штаммах бактерий, ассоциированных с растениями: *E. amylovora*, *E. "horticola"* и *Pantoea agglomerans*. Изоляты *E. amylovora* из мест поражения растений ожогом, которые выделяли одновременно с фагами, являются устойчивыми к вирусной инфекции. Эту особенность пока трудно объяснить, однако, замечено, что фагоустойчивость может кардинально изменяться при диссоциации, лизогенизации и мутагенезе эрвиний в лабораторных условиях. Исследование фаговых популяций показывает, что они гетерогенны и, очевидно, могут включать не только поливалентные, но и специфические вирусы.*

Последующее изучение биологии и молекулярной генетики чистых линий изолированных фагов позволит приблизиться к пониманию места и роли бактериофагов в сети сложных взаимоотношений бактериальный патоген – растение.

*Ключевые слова: бактериальный ожог, *Erwinia amylovora*, энтеробактерии, поливалентные бактериофаги, экология.*

В природе существуют два типа бактериофагов – специфические и поливалентные. Фаги первого типа инфицируют ограниченное число штаммов одного и того же вида бактерий. Поливалентные фаги могут заражать и репродуцироваться в клетках не только различных штаммов и видов, но родов и групп бактерий [3, 6]. Преодоление вирусом межродовых границ является уникальным явлением; в его основе лежит ряд сложных механизмов [8, 9, 10].

Поливалентность имеет фундаментальное значение для вирусологии, так как некоторые особо опасные инфекции персистируют в окружающей среде за счет расширения круга хозяев для соответствующих вирусов [7]. С другой стороны, ее практическая значимость для биологического контроля численности микробных популяций не вызывает сомнения.

Несмотря на их фундаментальную и практическую важность, бактериофаги с широким кругом хозяев в современной научной литературе описываются редко, а экспериментальные модели для изучения фаговой поливалентности пока не разработаны. В данной работе мы попытались обнаружить и описать поливалентные фаги узкой экологической ниши, ограниченной плодовыми деревьями и *Erwinia amylovora* (Burill 1882) Winslow et al. 1920, в период появления симптомов бактериального ожога.

Материалы и методы. Возбудители бактериального ожога плодовых деревьев были выделены из пораженных деревьев айвы (*Cydonia oblonga* Mill.), груши (*Pyrus communis* L.) и яблони (*Malus domestica* Borkh.) в Ужгородском районе Закарпатской области во время активной вегетации растений на протяжении мая – сентября 2012 г.

Патогенные свойства изолятов определяли методом Уайта на незрелых плодах груши, а также искусственным заражением здоровых побегов груши [11]. Для идентификации бактерий изучали их фенотипические свойства общепринятыми методами [11], сравнивая с типовым штаммом *E. amylovora*, а также в соответствии с Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [5]. При идентификации проводили также реакцию агглютинации на стекле с поливалентной сывороткой, полученной к *E. amylovora* 9057 и 8507, любезно предоставленной Л.М. Яковлевой.

© Ф.И. Товкач, С.Н. Мороз, Н.А. Король, Ю.В. Файдюк, А.И. Кушкина, 2013

Бактериофаги изолировали из того же пораженного материала (подсохшие почки, сухие листья, ветки) экстракцией в жидкую среду LB (500 мг на 3 мл), длительность которой составляла 18 часов при 4° С.

В качестве негативного контроля использовали ветки груши из Винницкой области без явных симптомов ожога и других признаков заболевания.

В работе использовали типовой штамм *E. amylovora* (*Eam*) 9057 (ATCC 15580), выделенный из груши R. Lelliot в 1959 г., и штамм этой бактерии K8 (ATCC 29850), изолированный из груши J.E. Crosse в 1958 г. – оба из Великобритании. Штаммы *E. amylovora* Л4, Л6 и Л7 выделены М.И. Лукач в период 1999-2000 гг. в Черновицкой области из пораженных деревьев груши; штаммы K4 и K5 изолированы из плодовых растений Н.И. Клинковой в 1989 г на юге СССР. Амилвороподобные бактерии черного бактериоза бука лесного *Erwinia "horticola"* (*Eho*) 60, 120 и 450 и возбудители черного бактериоза яблони *E. "horticola"* 43I, 43II и 23a выделены К.И. Бельтюковой в 1968–1969 гг. [1]. Все указанные бактерии получены авторами из коллекции фитопатогенных бактерий Института микробиологии и вирусологии НАН Украины. Искусственно лизогенизированные производные штаммов *E. "horticola"* 450 и 60 – 450(59), 450(49) и 60(59, E105), – а также диссоцианты штамма 60 были получены ранее при изучении лизогении с участием умеренных фагов 59, 49 и E105 [4]. Мутанты штаммов 60, 43I и 43II, устойчивые к налидиксовой кислоте, выделены при выполнении данной работы.

Штаммы *Pantoea agglomerans* (*Pag*) EH1, 28/2-1, 28/2-2, 9/7-1, 9/7-2, g150 и g157, а также *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) Ec153s, Ec153b и J2 предоставлены проф. Ю.К. Фомичевым из Белорусского государственного университета. Штаммы *Pcc* 8982 и 8447 были получены из коллекции фитопатогенных бактерий ИМВ НАНУ, лабораторные штаммы *Escherichia coli* CR63, C1a, BE и K12, а также бактериофаги 59, 49, E105 и FE44 – из отдела молекулярной генетики бактериофагов ИМВ НАНУ.

Эксперименты проводили на основе стандартных фаговых методов, описанных нами ранее [2, 4].

Результаты. Бактерии, изолированные из пораженных ожогом плодовых деревьев, представляли собой граммотрицательные неспорообразующие подвижные перитрихальные палочки, образующие на пластинках картофельного агара мелкие полупрозрачные кремово-белые колонии с приподнятым центром и ровными краями. На среде Кинг Б флуоресцирующий пигмент не образуют, оксидазоотрицательные, каталазоположительные, факультативные анаэробы. Все изоляты способны продуцировать леван, но не образуют индол и сероводород, не редуцируют нитраты. Используют цитрат, утилизируют с образованием кислоты глюкозу, рибозу, трегалозу, фруктозу, сахарозу, галактозу, целлобиозу, арабинозу, ксилозу, маннит, сорбит, подщелачивают лакмусовую сыворотку, разжижают желатин. Не ферментируют лактозу, мальтозу, рамнозу, раффинозу и дульцит, не растут при 39° С и в 5 % NaCl, не образуют пектолитических ферментов.

Все изоляты патогенны в тесте Уайта на незрелых плодах груши и вызывают поражение побегов груши при искусственном заражении суспензией бактерий. Бактерии дают положительную реакцию агглютинации с поливалентной сывороткой, полученной к *E. amylovora* 9057 и 8507.

Таким образом, по фенотипическим и патогенным свойствам выделенные нами из разных растений-хозяев изоляты представляют собой гомогенную группу, сходную с типовым штаммом *E. amylovora* и соответствуют характеристикам этого вида согласно Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [5].

В последующих исследованиях использовали три основных штамма *E. amylovora* МА, МГ и МЯ, которые были изолированы из пораженных айвы, груши и яблони соответственно. В контрольном исследовании (груша из Винницкой области – условное обозначение ТГ) патогена обнаружено не было.

После перекрестного титрования вирусных изолятов из тех же трех видов пораженного материала и контроля, которые были обозначены как рМА, рМГ, рМЯ и рТГ (контрольный образец), с помощью двухслойных агаровых чашек нам не удалось обнаружить признаков фаголизиса указанных штаммов *E. amylovora*. Повторная экстракция фагов из растительного материала и проверка фагочувствительности штаммов не привели к положительным результатам – указанные штаммы оставались устойчивыми к вирусам.

Поэтому, далее, в качестве индикаторных для идентификации фагов использовали музейные штаммы *E. "horticola"*, *P. agglomerans*, *E. amylovora*, *E. coli* и *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Для того, чтобы определить поливалентную природу и максимально учесть разнообразие бактериофагов в симптомных поражениях плодовых растений фитопатогеном *E. amylovora*, в этой работе не использовали таких стандартных процедур как получение чистой линии фага или его обогащение с помощью применения какого-либо одного чувствительного штамма.

Как видно из табл. 1, вирусы, полученные экстракцией из двух образцов пораженной айвы (рМА₁ и рМА₂), образцов груши (рМГ) и яблони (рМЯ) образуют отдельные негативные колонии на газонах многих штаммов *E. "horticola"*, всех использованных штаммов *P. agglomerans* и только одного из десяти штаммов *E. amylovora*. Изолят рМА₁ оказался наиболее активным на этих штаммах; содержащиеся в нем фаги лизировали 8 из 10-ти штаммов *Eho*, *Eam* и *Pag*. Он характеризовался сравнительно высокими значениями титра, которые достигали 10⁴ БОЕ/мл. Инфекция поддерживалась нормально при повторном пассировании фагов. Другой крайний случай представлял изолят из пораженной яблони, рМЯ. Фаги этого образца инфицировали единственный штамм – *Eho* 60-1n, который, однако, не поддерживал фаговой инфекции при последующих пассажах.

Таблица 1

Чувствительность штаммов *E. "horticola"*, *P. agglomerans* и *E. amylovora* к фагам, выделенных из айвы (рМА₁, рМА₂), груши (рМГ) и яблони (рМЯ), пораженных бактериальным ожогом

Индикатор			Изолят фага (первичная популяция фага)			
Род, вид*	Штамм	Фаза роста**	рМА ₁	рМА ₂	рМГ	рМЯ
<i>Eho</i>	60-3m	Ex	-	2,0 x 10 ²	-	-
	60-1n	Ex	4,0 x 10 ²	-	3,6 x 10 ³	6,0 x 10 ²
	60 (59, E105)	Ex	-	-	4,0 x 10 ³	-
	43I	Ex	6,0 x 10 ³	-	-	-
	43II	Ex	3,2 x 10 ³	6,0 x 10 ²	-	-
<i>Pag</i>	g150	Ex	5,5 x 10 ³	-	-	-
		St	4,5 x 10 ³	-	-	-
	g157	Ex	6,0 x 10 ³	1,0 x 10 ²	7,5 x 10 ³	-
		St	6,0 x 10 ³	1,0 x 10 ²	7,5 x 10 ³	-
	9/7 - 1	Ex	1,4 x 10 ⁴	-	5,7 x 10 ³	-
	9/7 - 2	St	2,0 x 10 ³	-	1,5 x 10 ³	-
<i>Eam</i>	K8	Ex	8,0 x 10 ³	-	-	-

Примечание: « * » – здесь и в табл. 2 и 3, “*Eho*” означает *E. "horticola"*; “*Pag*” – *P. agglomerans* и “*Eam*” – *E. amylovora*. « ** » – для проверки эффективности посева фаг высевали на газон бактериальных клеток, находящихся в экспоненциальной (Ex) или стационарной (St) фазе роста. « - » – отсутствие отдельных фаговых бляшек на бактериальном газоне индикатора.

Изоляты рМА₂ и рМГ инфицировали 3 и 4 штамма соответственно, и последующее реинфицирование ими чувствительных бактерий, в отличие от рМЯ, давало позитивные результаты.

Титр фагов рМГ был в среднем на порядок выше, чем таковой рМА₂; оба изолята отличались кругом чувствительных хозяев, за исключением *Pag g157*, на котором эти изоляты давали негативные фаговые колонии (табл. 1).

Фаги всех четырех изолятов образуют прозрачные негативные колонии на газонах чувствительных культур (рисунок); их морфология в случае рМА₂ часто не очень четко выражена, что затрудняет учет количества бляшкообразующих единиц. Отсутствие лизогенизации, скорее всего, свидетельствует о наличии в образцах вирулентных вирусов. Доказательство вирулентности бактериофагов было получено также при их титровании на бактериальных клетках одного и того же индикатора, находящихся в экспоненциальной (Ex) и стационарной (St) фазах роста. Общеизвестно, что лизогенизация всегда приводит к падению эффективности посева при насыщении культуры. Поскольку эффективность посева на Ex/St – парах индикаторов не изменяется (табл. 1), фаги, очевидно, являются литическими. При титровании на газоне культуры *Eho 43П* вокруг прозрачных бляшек рМА₁ и, особенно, рМГ наблюдаются мутные широкие ореолы. Хотя причина образования ореолов неизвестна, по аналогии [12] можно допустить, что она связана с фаговым ферментом, способным деполимеризовать экзополисахаридную капсулу клеток указанного штамма. В отличие от опытных образцов, контрольный изолят рТГ не проявил фаговой активности на всех испытанных культурах.

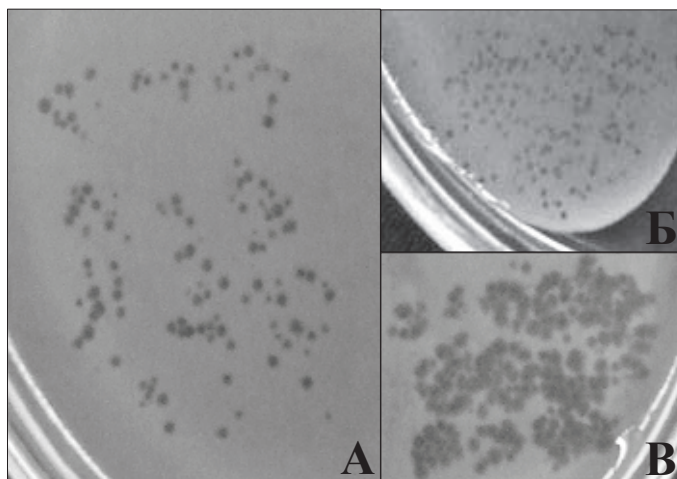


Рис. 1. Негативные колонии, образуемые фагами изолята рМА₁ на штаммах *P. agglomerans* g150 (А), g157 (Б) и 9/7-1 (В)

Анализ первичных фаговых популяций показывает, что обнаруженные нами бактериальные вирусы появляются вследствие патогенного процесса с участием *E. amylovora*, которая является возбудителем ожога айвы, груши и яблони.

Интересно, что изоляты из этих растений включают различные фаги, которые отличаются не только по кругу чувствительных хозяев, эффективности посева (ЭП) на различных индикаторах (табл. 1, и см. далее), а также по морфологии и размеру негативных колоний.

Как видно из табл. 1, изолированные фаги наиболее эффективно высеваются на штаммах *P. agglomerans*, причем на штамме g157 три изолята рМА₁, рМА₂ и рМГ дают негативные колонии. В последующих исследованиях определяли эффективность посева указанных изолятов, реклонированных на штаммах *Pag*.

Как и следовало ожидать, фаги размножались наиболее эффективно на бактериях, использованных для реклонирования – эффективность посева на *Pag g157*, g150 и 9/7-1 достигала единицы (табл. 2).

Таблица 2

Эффективность посева реклонированных бактериофагов

Фаг	<i>Eho</i>				<i>Eam</i>		<i>Pag</i>			
	60-3m	60-1n	43I	43II	L4	K8	9/7-1	9/7-2	g150	g157
pMA ₁ /g157	0,05	0,08	0,05	0,05	0,05	0,18	0,07	0,07	0,07	1,00
pMA ₁ /g150	0,10	-	0,01	0,07	0,22	0,25	0,84	0,56	1,00	0,81
pMA ₁ /9/7-1	0,12	-	0,20	0,12	0,07	0,08	1,00	0,63	0,80	0,80
pMG/g157	-	0,08	-	0,08	-	-	-	0,01	0,06	1,00
pMA ₁ /g157	0,004	-	0,06	0,004	0,004	0,04	0,09	0,05	0,07	1,00

Примечание: « - » – негативные колонии не обнаружены

Показатель эффективности посева находился в пределах 0,004 – 1,00. Наименьшие его значения характеризуют изолят pMA₁/g157, тогда как для изолята pMA₁/9/7-1 показательны достаточно высокие значения ЭП. Уменьшение эффективности посева pMA₁/g150, pMA₁/9/7-1 и pMA₂/g157 на штаммах *Eho* по сравнению с таковой на *Pag*, скорее всего, связано со смешанными фаговыми популяциями или с разнородностью фаговой популяции, которая может состоять из различных фаговых вариантов. Сравнительно однородными являются фаговые популяции изолятов pMA₁/g157 и pMG/g157, которые имеют незначительные различия в ЭП, при их высева на большинство испытанных штаммов (табл. 2).

Для последующего исследования поливалентности фагов, выделенных из мест поражений бактериальным ожогом, полученные изоляты были размножены на некоторых индикаторных штаммах фитопатогенных бактерий *E. "horticola"* и *E. amylovora* K8 (табл. 3). Изолят pMA₁, полученный через два пассажа на штамме *Eho* 60-3m, характеризовался явной гетерогенностью, которая проявлялась через наличие бляшек двух типов. Он был назван pГЕТ. Изолят pMA₁, проклонированный один раз на штамме *Eho* 60-3m, был гомогенным и проявлял большую активность на штамме *Eam* K8, чем pГЕТ. Оба изолята были обозначены римскими цифрами I и II соответственно. Два новых варианта изолята pMG, III и IV, полученные на штаммах *E. horticola* 60-1n и 43II соответственно, существенно не отличались друг от друга. Изолят V содержал фаги pMA₂, наработанные на *Eho* 60-3m, а изолят VI – фаги pMA₁, полученные на *E. amylovora* K8.

Для изолятов I – VI, адаптированных к репродукции на новых хозяевах, умеренных фагов 59, 49 и E105, а также поливалентного бактериофага FE44 определяли способность инфицировать представителей 4-х родов энтеробактерий (табл. 3). Для этого опыта было использовано более 40 штаммов.

Установлено, что изоляты I – VI эффективно заражают штаммы *P. agglomerans*, *E. "horticola"* и *E. amylovora*. С учетом показателя эффективности посева (табл. 1 и 2) можно утверждать, что фаги, представляющие эти изоляты, можно отнести к поливалентным. При этом интересным является тот факт, что данные вирусы наиболее часто и с большей эффективностью поражают штаммы *P. agglomerans*.

Умеренные фаги 59 и 49 являются узкоспецифичными [4], тогда как умеренный фаг E105 также проявляет поливалентность, преодолевая родовую границу и заражая 50 и 100 процентов представителей *E. "horticola"* и *P. agglomerans* соответственно. К инфицированию типичным поливалентным фагом FE44 чувствительны как *E. "horticola"*, так и *E. coli*. Что касается *P. carotovorum*, то ни один из использованных в работе изолятов и чистых фагов не проявляет инфекции на штаммах этой фитопатогенной бактерии.

Представленные в табл. 3 данные подтверждают широкое распространение поливалентных бактериофагов в пораженных ожогом растениях. Эти вирусы, очевидно, можно обозначить как группоспецифичные, так как они инфицируют виды энтеробактерий, которые сосуществуют в составе микробных сообществ в узкой экологической нише.

Несмотря на то, что поливалентные бактериофаги были выделены в период массовой эпидемии бактериального ожога, восприимчивость к ним основного возбудителя *E. amylovora* отсутствовала. Для объяснения этого необычного факта исследовали изменение фагочувствительности у амилвороподобной бактерии *E. "horticola"* 60, которая является универсальным индикатором для всех использованных в работе фагов (табл. 3).

Таблица 3

Частота (%) инфицирования энтеробактерий фаговыми изолятами и чистыми линиями фагов.

Изолят/фаг	Вид энтеробактерии				
	<i>Pag</i>	<i>Eho</i>	<i>Eam</i>	<i>Eco</i>	<i>Pcc</i>
I [pГЕТ/60-3m]	100	88	20	0	0
II [pМА ₁ /60-3m]	100	69	50	0	0
III [pМГ/60-1n]	100	50	0	0	0
IV [pМГ/43II]	100	59	0	0	0
V [pМА ₂ /60-3m]	86	88	0	0	0
VI [pМА ₂ /K8]	100	69	50	0	0
59	0	33	0	0	0
49	0	36	0	0	0
E105	100	50	0	0	0
FE44	X	53	0	100	0
Количество штаммов	7	15-18	10	4	5

Примечание: «x» – данные не получены

Исходная форма этого штамма 60-1n, которая, как было установлено с помощью визуальных наблюдений, представляет собой S-форму и проявляет максимальную чувствительность к 6-ти фаговым штокам (I – VI) и пяти индивидуальным фагам – 59, 49, E105, FE44 и FE44/60 (табл. 4). Диссоциант этого штамма, 60-3m, отобранный как R-форма, по неизвестным причинам теряет чувствительность к фагам 59, 49 и E105, а также к фагам, содержащимся в штоках III и IV. Фаги 59 и E105 не проявляют своей активности по отношению к лизогену 60 (59, E105). Это обусловлено лизогенной конверсией [5], вследствие которой, скорее всего, эта бактерия теряет чувствительность и к фагам из штоков II и VI, а также становится малочувствительной к фаговому штоку I.

Исходя из полученных данных, о фагочувствительности у *E. "horticola"* 60 можно говорить как об очень переменчивом показателе фенотипа. Это положение подтверждается и тем, что некоторые мутации, в частности в локусе, отвечающем за устойчивость клеток к действию налидиксовой кислоты, могут приводить к ее кардинальному изменению. Большинство из таких мутантов теряют чувствительность к умеренным фагам 49 и 59, а также поливалентному фагу FE44 (табл. 4).

Исходя из представленных результатов, можно допустить, что устойчивость к фагам у штаммов *E. amylovora*, выделенных одновременно с ними из мест ожогового поражения растений, может находиться на различных стадиях в зависимости от метастабильного состояния бактериальной популяции в данный момент времени. Фагочувствительность, скорее всего, формируется как в лабораторных, так и в естественных условиях за счет процессов диссоциации, лизогенизации и мутагенеза.

Таблица 4

Фагочувствительность штаммов *E. horticola* 60

Штаммы <i>E. horticola</i> 60	Фаги										
	I	II	III	IV	V	VI	59	49	E105	FE44	60
60 – 1n	+ ¹	+ ¹	+	+	+ ¹	+ ¹	+	+	+	+	+
60 – 1n/Nal ^r	+	+	+	+	+ ¹	+ ¹	-	-	+	-	-
60 – 3m	+	+	-	-	+ ¹	+	-	-	-	+	+
60(59, E105)	+ ¹	-	+	+	+ ¹	-	-	+	-	+	+

Примечание: +¹ – означает наличие непрозрачных бляшек.

Обсуждение результатов. Первичная популяция любого фага может быть рассмотрена как тот его изолят, который обнаружен в соответствующей экологической нише вместе со своей бактерией-хозяином в определенный период времени. Такая популяция, вероятнее всего, будет разнородной, и кроме основного фага будет включать другие, контаминирующие ее фаги, а также различные фаговые варианты и мутантные формы. В последующем может быть проведено обогащение искомого фага с помощью одного чувствительного бактериального штамма и, в конечном итоге, получение чистой вирусной линии после ряда последовательных пассажей. Эта двухэтапная процедура является общепринятой в классической бактериофагии; однако ее применение затрудняет выделение поливалентных фагов и приводит, как правило, к получению специфических вирусов, т.е. вирусов с ограниченным кругом бактерий-хозяев. С другой стороны, обогащение основной фаговой популяции значительно сужает сферу исследований, делает маловероятным обнаружение бактериальных вирусов, полезных для биоконтроля патогенных микробов.

Для оценки первичных фаговых популяций, ассоциированных с *E. amylovora*, мы разработали модельную систему на основе набора индикаторных энтеробактерий, которые имеют отношение к бактериальным заболеваниям древесных растений (ожог плодовых – *E. amylovora*, и черный бактериоз бука и плодовых – *E. "horticola"*), или сопровождают эти заболевания как эпифиты или эндифиты (*P. agglomerans*). В эту систему были включены также три умеренных фага (59, 49 и E105) и один поливалентный вирулентный бактериофаг (FE44), которые способны репродуцироваться в клетках *E. "horticola"* 60 и 450.

Использование предложенной системы позволило установить ряд важных закономерностей.

Первичные фаговые популяции включают бактериофаги, которые появляются вследствие патологического процесса, обусловленного *E. amylovora* и сопровождают развитие ожога при вегетации зараженных растений. Фаговые изоляты пораженных ожогом айвы и груши содержат поливалентные вирулентные фаги, которые эффективно размножаются на штаммах *E. amylovora*, *E. "horticola"* и *P. agglomerans*. В последнем случае эффективность их посева и частота инфицирования достигает 100%-ного максимума. Поскольку эти фаги не инфицируют представителей таких энтеробактерий, как *Escherichia* и *Pectobacterium*, можно считать, что их поливалентность распространяется только на бактерии, ассоциированные с растениями, и носит групповой характер. Фаговые изоляты пораженных айвы, груши и яблони включают вирусы, которые отличаются морфологией негативных колоний, кругом хозяев и эффективностью посева. То, что эти фаги характеризуются частицами различных морфотипов, показано также с помощью электронной микроскопии (данные не представлены). Этот факт свидетельствует о сложности бактериальных консорциумов, которые являются уникальными в случае каждого вида растения и имеют сложную динамику развития при патогенезе. Наличие полной устойчивости к изолированным фагам у штаммов *E. amylovora*, выделенных одновременно с ними из мест поражения растений ожогом, пока трудно объяснить, однако она понятна в терминах высокой вирулентности при патогенезе. Возможно, это свойство утрачивается бактерией в связи с естественными процессами диссоциации, лизогенизации и мутагенеза. Исследование фаговых популяций показывает, что они гетерогенны и, очевидно, могут включать не только поливалентные, но и специфические вирусы.

Последующее изучение физиологии и молекулярной генетики чистых линий фагов позволит приблизиться к пониманию места и роли бактериофагов в сети сложных взаимоотношений *E. amylovora* – растение.

Ф.І. Товкач, С.М. Мороз, Н.А. Король, Ю.В. Файдюк, А.І. Кушкіна

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

ПОЛІВАЛЕНТНІСТЬ БАКТЕРІОФАГІВ, ІЗОЛЬОВАНИХ З ПЛОДОВИХ ДЕРЕВ, УРАЖЕНИХ БАКТЕРІАЛЬНИМ ОПІКОМ

Резюме

Виявлено та описано фагові популяції, що з'являються внаслідок патологічного процесу, обумовленого *Erwinia amylovora*, і супроводжують розвиток опіку в процесі вегетації айви, груші та яблуні в Закарпатському регіоні України. Фагові ізоляти з уражених айви і груші містять різні полівалентні вірулентні фаги, які здатні розмножуватися на штаммах бактерій, асоційованих із рослинами – *E. amylovora*, *E. "horticola"* і *Pantoea agglomerans*. Ізоляти *E. amylovora* з місць ураження рослин опіком, які виділяли одночасно з фагами, є стійкими до вірусної інфекції. Цю особливість поки складно пояснити, проте було помічено, що фагостійкість може кардинально змінюватися при дисоціації, лізогенізації та мутагенезі ервінії в лабораторних умовах. Дослідження фагових популяцій показує, що вони гетерогенні і, очевидно, можуть включати не лише полівалентні, але і специфічні віруси.

Наступне вивчення біології та молекулярної генетики чистих ліній ізольованих фагів дозволить наблизитися до розуміння місця і ролі бактеріофагів у системі складних відносин бактеріальних патогенів з рослинами.

Ключові слова: *бактеріальний опік, Erwinia amylovora, ентеробактерії, полівалентні бактеріофаги, екологія.*

F.I. Tovkach, S.M. Moroz, N.A. Korol, I.V. Faidiuk, A.I. Kushkina

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

POLYVALENCE OF BACTERIOPHAGES ISOLATED FROM FRUIT TREES, AFFECTED BY BACTERIAL FIRE BLIGHT

S u m m a r y

Phage populations appearing as a result of a pathogenic process caused by *Erwinia amylovora* have been discovered and described. They accompany bacterial fire blight development in the process of quince, pear and apple trees vegetation in Zakarpattia region of Ukraine. Phage isolates of the affected pear and quince include polyvalent virulent phages able to develop on bacterial strains associated with plants – *E. amylovora*, *E. "horticola"* and *Pantoea agglomerans*. *E. amylovora* isolated from the plant tissues affected by the fire blight and detected at the same time as phages proved to be resistant to the viral infection. It is hard to explain now this characteristic however it was noticed that resistance to phages can change drastically in case of dissociation, lysogenization and mutagenesis of erwinia in laboratory conditions. Phage population study shows that they are heterogeneous and can obviously include not only polyvalent but also specific viruses.

Further studies of biology and molecular genetics of pure lines of isolated phages will help to get closer to understanding the place and role of bacteriophages in the complicated network of relations between bacterial pathogens and plants.

The paper is presented in Russian.

К е у в о р д s: fire blight, *Erwinia amylovora*, enterobacteria, polyvalent bacteriophages, ecology.

The author's address: *Tovkach F.I.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Бельтюкова К.Г., Гвоздяк Р.И., Пастушенко Л.Т., Зуйкова Н.Ф. *Erwinia horticola* sp. nova – новый збудник захворювання бука та плодових дерев // Мікробіол. журн. – 1972. – 34, №1. – С. 104–106.
2. Товкач Ф.И. Изучение фагоустойчивости с помощью умеренного бактериофага ZF40 // Микробиология. – 2002. – 71, №1. – С. 82–88.
3. Товкач Ф.И. Молекулярно-биологические свойства вирулентного бактериофага FE44 // Доповіді Національної академії наук України. – 2002. – №6. – С. 175–178.
4. Товкач Ф.И., Шевченко Т.В., Горб Т.Е., Муквич Н.С., Романюк Л.В. Сравнительное изучение умеренных эрвиниофагов 49 и 59 // Микробиол. журн. – 2002. – 64, №2. – С. 65–81.
5. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria / Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.R. (Vol. Eds.), Garrity G.M. (Ed.-Ch.). – USA: Springer, 2005. – 1106 p.
6. Born Y., Fieseler L., Marazzi J., Lurz., Duffy B., Loessner M.J. Novel virulent and broad-host-range *Erwinia amylovora* bacteriophages reveal a high degree of mosaicism and a relationship to *Enterobacteriaceae* phages // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – 77, N 17. – P.5945–5954.
7. Davison A. J., Benko M., Harrach B. Genetic content and evolution of adenoviruses // J. Gen. Virol. – 2003. – 84. – P. 2895–2908.
8. Hoskisson P.A., Smith M.C.M. Hypervariation and phase variation in the bacteriophage 'resistome' // Curr. Opinion Microbiol. – 2007. – 10. – P. 396–400.
9. Kruger D.H., Hansen S., Reuter M. The *ocr⁺* gene function of bacterial viruses T3 and T7 counter-acts the Salmonella typhimurium DNA restriction systems SA and SB // J. Virol. – 1983. – 45, N 5. – P. 1147–1149.
10. Lobočka M.B., Rose D.J., Plunkett G., Rusin M., Samoedny A., Lehnher H., Yarmolinsky M.B., Blattner F.R. Genome of Bacteriophage P1 // J.Bacteriol. – 2004. – 186, N 21. – P. 7032–7068.
11. Methods in Phytobacteriology /Eds Klement Z., Rudolph K., Sands D.C. – Budapest: Akadémiai Kaidó, 1990. – 568 p.
12. Schnabel E.L., Jones A.L. Isolation and characterization of five *Erwinia amylovora* bacteriophages and assessment of phage resistance in strains of *Erwinia amylovora* // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – 67, N 1. – P. 59–64.

Отримано 13.09. 2012