

Л.И. Семчук, С.А. Ромашев

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,
ОНЦ «Институт биологии»; ул. Владимирская 64/13, Киев, 01033, Украина

ВЛИЯНИЕ СМЕНЫ ХОЗЯИНА НА ФАГИ 223-17 И 7591-14 *PSEUDOMONAS SAVASTANOI* PV. *TABACI*

Изучали особенности фагов 223-17 и 7591-14 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, до и после адаптации на промежуточном хозяине *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, с повторным возвращением их к исходному штамму. Было установлено, что фаги, полученные после размножения на pv. *phaseolicola* приобрели способность лизировать ранее резистентные к ним бактерии: *P. viridiflava* (фаг 223-17) и *P. fluorescens* (фаг 7591-14). Общей закономерностью было то, что при рестрикционном анализе ДНК фагов, размножавшихся на pv. *tabaci*, наряду с мажорными, всегда наблюдали образование дополнительных минорных фрагментов. При этом ДНК фагов не меняли своей длины. У обоих фагов, в начале исследований обнаруживали по два идентичных по длине минорных *EcoRV* фрагмента ДНК. При смене хозяина они исчезали. После возвращения к первому хозяину обнаруживали ранее отсутствующие, дополнительные минорные *HindIII* фрагменты ДНК. У фага 7591-14 их было два, а у фага 223-17 один. Образование минорных *EcoRV* фрагментов ДНК, очевидно, связано с возникновением дополнительного сайта рестрикции, так как сумма их длин была равна размеру одного из мажорных фрагментов. Минорные *HindIII* фрагменты, размеры которых были равны сумме длин соответственно двух или трех мажорных фрагментов, наоборот, могли быть образованы вследствие потери нескольких сайтов рестрикции. Поскольку воздействие на ДНК фагов ферментных систем хозяина сопровождалось синхронным приобретением или потерей минорных фрагментов ДНК, то, очевидно, этот процесс не носит случайный характер. Слабая люминесценция минорных фрагментов значительной протяженности указывает на то, что их удельный вес общем пуле ДНК невелик. Происходящие изменения у фагов, очевидно, связаны с процессом их адаптации к разным хозяевам.

Ключевые слова: *Pseudomonas syringae*, *P. savastanoi*, фаги, смена хозяев.

В схемах экологических пирамид вирусы в целом, и фаги, в частности, упоминаются редко. Обсуждая роль фагов в экосистемах, исследователи отмечали лишь то, что они играли редуцирующую роль [11]. Однако понятно, что для вирусов микроорганизмов этим их роль не ограничивается. Ее понимание нуждается в изучении механизмов, обеспечивающих сохранение, распространение и эволюцию фагов в природе. Такие данные важны для практического использования фагов, как возможных экологически чистых средств защиты от бактериальных возбудителей болезней.

В наших исследованиях изучали фаги, активные против фитопатогенных бактерий. На поверхности одного листа растения одновременно могут располагаться участки, содержащие разные виды доминирующих бактерий и инфицированные разными фагами. Сложность изучения их экологии заключается в том, что эволюционные процессы у фагов могут происходить на очень маленькой площади, несколько квадратных сантиметров [15]. Учитывая то, что в природе срок сохранения активности фагов довольно короткий [1], то для них важно поддержание численности популяции. Ресурс чувствительной бактерии ограничен, вследствие чего возникают условия, когда фагам необходимо адаптироваться к новым штаммам бактерий. Однако большинство фагов имеет узкий диапазон хозяев, а емкость их геномов ограничена. Решением проблемы может быть использование фагами ресурсов чувствительной бактерии.

Целью наших исследований было изучение влияния смены хозяев на фаги 223-17 и 7591-14, прошедшие репродуктивные циклы на основном, *P. syringae* pv. *tabaci* IMV 223 и промежуточном, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* IMV 4013, штаммах, с повторным возвращением к исходному.

Материалы и методы. Используемые в работе штаммы были получены из музея фитопатогенных бактерий Института микробиологии и вирусологии имени академика Д.К. Заболотного НАН Украины. Из них два, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* IMV 4013 и *P. syringae* pv. *tabaci* IMV 223 использовали в качестве основного и промежуточного хозяев фагов. Для

определения диапазона хозяев фагов дополнительно использовали штаммы: *P. syringae* pv. *aptata* IMV 185, *P. viridiflava* IMV 8867, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* IMV 4228, *P. alliicola* 8494, *P. syringae* pv. *syringae* IMV 8653, *P. syringae* pv. *syringae* IMV 8653, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* IMV 4228, *P. fluorescens* IMV 8573, *P. viridiflava* IMV 8867, *P. viridiflava* IMV 8868 и *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*) IMV 216. Бактерии поддерживали на 1,5 % коммерческом агаре, содержащем рыбный гидролизат. Фаги 223-17 и 7591-14 были выделены в нашей лаборатории из растительных образцов. При каждой смене хозяина фаги адаптировали к нему путем шести пассажей. При проведении пассажа вырезали по десять бляшек из чашки. Их вносили в 10 мл бульона и титровали по Грациа [2]. Титр отражал усредненное количество инфекционных частиц в одной бляшке.

При накоплении фагов использовали коммерческий рыбный бульон. Репродукция фагов проходила в условиях непрерывной аэрации, создаваемой с помощью компрессора, при температуре 25 °C [5]. Лизис культуры наступал через 3-6 ч. Титры фаголизатов составляли 10⁹-10¹⁰ БОЕ/мл. Очистку и концентрацию фагов проводили двумя циклами дифференциального центрифугирования, при 5000 g, в течение 20 мин и при 90 000g, в течение 2 ч. ДНК фагов выделяли безфенольным методом в авторской модификации [7]. Рестрикционный анализ ДНК проводили по Маниатису [4], с применением специфических эндонуклеаз HindIII и EcoRV (Serva). Гидролизованые ДНК разделяли в 0,7 % агарозе, используя TBE буфер [4].

Результаты и их обсуждение. Сравнение поколений фагов, прошедших адаптацию к промежуточному хозяину и после их возвращения к исходному штамму, позволяет моделировать влияние бактерий в экосистеме на свойства вирусов. Для исследуемых фагов с близкими биологическими характеристиками было достаточно одного акта заражения нового хозяина, чтобы они расширили диапазон литической активности на два штамма, по одному для каждого фага (табл. 1). Диапазон хозяев фагов определяли, используя все бактерии, указанные в разделе «Материалы и методы», однако в табл. 1 указаны только те из них, которые оказались чувствительными.

Таблица 1

Изменение диапазонов хозяев у фагов 223 -17 и 7591 -14 после одного пассажа на штамме *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* IMV4228

Название фага, с указанием штамма хозяина, на котором проходили пассажи	Штаммы бактерий, по отношению к которым выявлена литическая активность фага				
	<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> IMV 185	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> IMV 223	<i>P. viridiflava</i> IMV 8868	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> IMV 4228	<i>P. fluorescens</i> IMV 8573
223 -17 pv. <i>tabaci</i>	+	+	-	+	-
223 -17 pv. <i>phaseolicola</i>	+	+	-	+	+
7591 -14 pv. <i>tabaci</i>	+	+	-	+	-
7591 -14 pv. <i>phaseolicola</i>	+	+	+	+	-

+ фаг способен лизировать штамм

- штамм устойчив к фагу

Смена хозяина требовала от фагов способности адаптации к новому штамму, в условиях воздействия на него систем рестрикции-модификации бактерии («host-controlled restriction») [8, 13]. Их влияние видно на табл. 2, по падению титров у фагов, определенных для одной негативной колонии. На первом пассаже титр фагов падал на два и больше порядка, что составляло свыше 99 %. Способность к размножению на новом хозяине обнаруживала лишь незначительная часть каждой популяции. Визуально такие бляшки, содержащие преимущественно дефектные частицы, имели типичную морфологию и не отличались от исходных. В связи с чем перед изучением воздействия нового хозяина на фаги проводили пассажи последних. Как видно из табл. 2, максимальных значений титры фагов достигали после третьего пассажа.

Таблица 2

**Изменение числа инфекционных частиц, содержащихся в одной
бляшке у фагов 223-17 и 7591-14 при их адаптации к хозяину**

Название фага, с указанием штамма хозяина, на котором проходили пассажи	Титр фагов, содержащихся в одной негативной колонии (БОЕ/мл) для каждого пассажа					
	1 пассаж	2 пассаж	3 пассаж	4 пассаж	5 пассаж	6 пассаж
Фаг 223 -17 <i>rv. tabaci</i>	*	*	*	*	*	5x10 ⁶
Фаг 223 -17, <i>rv. phaseolicola</i>	10 ³	3x10 ⁴	3x10 ⁴	4x10 ⁴	4x10 ⁴	2x10 ⁵
223 -17 повторно на <i>rv. tabaci</i>	6x10 ⁵	6x10 ⁶	7x10 ⁶	6x10 ⁶	6x10 ⁶	6x10 ⁶
Фаг 7591 -14 <i>rv. tabaci</i>	*	*	*	*	*	4x10 ⁶
Фаг 7591 -14 <i>rv. phaseolicola</i>	2x10 ³	3x10 ⁴	3x10 ⁴	3x10 ⁵	3x10 ⁵	3x10 ⁵
7591-14 повторно на <i>rv. tabaci</i>	9x10 ⁵	4x10 ⁵	5x10 ⁵	5x10 ⁵	5x10 ⁵	6x10 ⁵

* пассажи не проводились, так как фаги постоянно поддерживались на этом штамме.

Нужно заметить, что при выделении фагов из внешней среды, определить, является ли используемый штамм подходящим хозяином, по результатам одного пассажа было нельзя. Свидетельством того, что получена стабильная линия фагов, было сохранение ими инфекционных свойств, при проведении не менее чем трех пассажей. Этого было достаточно, чтобы при их репродукции в непермисивных условиях полностью проявился эффект «угасания» их литической активности [6].

Влияние хозяев на ДНК фагов изучали с помощью рестрикционного анализа, используя специфические эндонуклеазы EcoRV и HindIII (рис. 1). С этой целью, после полной адаптации к очередному хозяину, из них выделяли ДНК. При сравнении полученных рестрикционных фрагментов ДНК, общей закономерностью было то, что после репродукции фагов на *rv. tabaci*, у них помимо мажорных полос выявляли слабо люминесцирующие минорные полосы ДНК.

Объяснить их происхождение исключительно эффектом Star Activity [9], когда при определенных условиях специфическая рестриктаза режет ДНК по неспецифическим или частично вырожденным сайтам, с образованием «дополнительных полос», в данном случае было сложно. По нашему мнению наблюдаемый эффект связан с воздействием хозяина.

При гидролизе эндонуклеазой EcoRV ДНК фагов, поддерживаемых на *rv. phaseolicola*, у них наблюдали образование трех мажорных фрагментов (20 400 п.о., 17 800 п.о., 3200 п.о.) и двух минорных (9900 п.о. и 7900 п.о.). Появление последних не связано с увеличением геномов, так как мажорные фрагменты ДНК у фагов, накопленных на обоих хозяевах, были одинаковой длины.

Образование минорных EcoRV фрагментов ДНК, очевидно, связано с возникновением дополнительного сайта рестрикции. Размер одного из мажорных фрагментов был равен сумме длин минорных (9 900 п.о. + 7900 п.о. = 17 800). Слабая люминесценция в геле минорных фрагментов при значительной длине свидетельствует, что их удельный вес в общем пуле ДНК был невелик. Очевидно, дополнительный сайт возникал не у всех фрагментов ДНК такой длины.

После пассажей фагов на промежуточном хозяине, *rv. phaseolicola*, минорные EcoRV фрагменты ДНК исчезали. Однако, после повторного размножения на *rv. tabaci* появлялись другие минорные фрагменты ДНК, выявляемые эндонуклеазой HindIII. Размер геномов рассчитанный по сумме длин трех мажорных EcoRV фрагментов ДНК был одинаковым для обоих фагов и составлял 41 400 п.о. У обоих фагов выявляли по семь HindIII мажорных полос ДНК. Сумма длин семи HindIII фрагментов ДНК была значительно меньше указанного значения. Из этого был сделан вывод, что геномы фагов гидролизовались на большее число фрагментов, однако несколько из них имели одинаковую длину. Это утверждение подтверждалось высокой интенсивностью люминесценции коротких фрагментов ДНК, которая обычно значительно ниже, чем у длинных. Согласно расчетам, геномы фагов состояли из двенадцати

HindIII фрагментов ДНК: 7600 п.о, 5500 п.о, 4300 п.о, 3800 п.о, 3800 п.о, 3000 п.о, 3000 п.о, 2500 п.о, 2500 п.о, 1800 п.о, 1800 п.о, 1800 п.о.

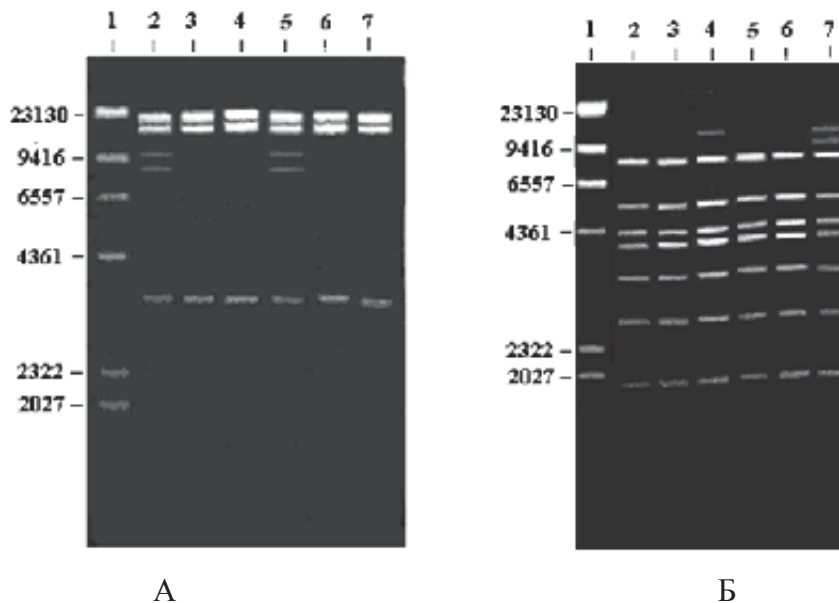


Рис. 1. Трек 1 – ДНК фага λ , обработанная HindIII. Профили разделения фрагментов ДНК фагов 223-17 (треки 2, 3, 4) и 7591 - 14 (треки 5, 6, 7), обработанные ферментами EcoRV (А) и HindIII (Б). Фаги выращенные на штамме *pv. tabaci* (треки 2, 5), на промежуточном хозяине *pv. phaseolicola* (треки 3, 6), повторно адаптированы к *pv. tabaci* (треки 4,7).

У фага 7591-14 обнаруживали два минорных HindIII фрагмента (12300 п.о. и 11 900 п.о.), а у фага 223-17 один (12 300 п.о.). Соответственно, они могли быть образованы вследствие потери одного (4300 п.о. + 7600 п.о. = 11 900 п.о.) или двух (3800 п.о. + 3000 п.о. + 5500 п.о. = 12 300 п.о.) сайтов рестрикции HindIII.

В представленных исследованиях анализировали популяции, образованные дочерними генерациями десяти негативных колоний. То есть, в результате случайной выборки наблюдаемое влияние хозяина на фаги, сопровождающееся образованием минорных фрагментов ДНК, могло относиться к потомству только одной из них. Такое предположение основано на полученных нами экспериментальных данных, относительно изменений, наблюдаемых у мутантов фага 8573sm, способных заражать один из девяти клонов фагорезистентных мутантов штамма *Pseudomonas fluorescens* [3]. В исследовании изучали отдельно потомство только одной фаговой бляшки, для каждого измененного клона хозяина. В результате, из девяти изолятов фагов, способных размножаться на резистентных мутантах хозяина, у нескольких выявили изменение картины распределения рестрикционных фрагментов ДНК. У них появлялись дополнительные фрагменты ДНК, отсутствующие в материнском геноме. Однако они были мажорными [3].

Появление дополнительных фрагментов при смене хозяина наблюдали и в других системах «фаг-бактерия». В частности, при смене штамма *Escherichia*, на *Salmonella* фаг ϕ X174 терял три фрагмента ДНК в одном из генов. После возвращения к первому хозяину фаг восстанавливал строение измененного участка генома [10]. В другом исследовании, Santos S.B. и др., изучая фаг ϕ i PVP-SE1 *Salmonella enterica*, после его выращивания на *Escherichia coli*, не обнаружили ни изменений спектра литической активности, ни чувствительности к рестриктазам [14].

Таким образом, представленные в данной работе исследования позволяют считать, что образование минорных фрагментов связано с воздействием на ДНК фагов систем рестрикции-модификации и, возможно, репарации хозяина, штамма *P. syringae pv. tabaci*. Этот вывод вытекает из того, что у фагов, выращенных на другом штамме, *P. savastanoi pv. phaseolicola*,

минорные фрагменты ДНК отсутствовали. Поскольку воздействие на ДНК фагов ферментных систем хозяина сопровождалось синхронным приобретением или потерей минорных фрагментов ДНК, то очевидно, этот процесс не носит случайный характер.

Наблюдаемое при смене хозяина расширение у фагов спектра литической активности связано с рекомбинацией фагов с профагами хозяина или с участками CRISPR-локусов [12]. Для последних возможность встраивания в геном фагов пока не доказана, однако ее нельзя исключать. Исходя из того, что рестрикционные фрагменты ДНК у фагов до и после смены хозяина были одинаковой длины, то вопрос об области интеграции и размерах рекомбинантных участков в хромосомах фагов остается открытым.

Выявленные особенности фагов 223-17 и 7591-14, по нашему мнению, связаны с процессом их адаптации к разным хозяевам и необходимостью быстро эволюционировать, что позволяет им присутствовать в экосистеме.

Л. І. Семчук, С. А. Ромашев

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка
ОНЦ «Інститут біології»*

ВПЛИВ ЗМІНИ ХАЗЯЇНА НА ФАГИ 223 -17 ТА 7591-14 *PSEUDOMONAS SAVASTANOI PV. TABACI*

Резюме

Вивчали особливості фагів 223-17 та 7591-14, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, до і після їх адаптації на проміжному хазяїні, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, а також після їх повернення до вихідного штаму. Було встановлено, що, після розмноження фагів на pv. *phaseolicola*, вони отримали здатність викликати лізис раніше резистентних до них бактерій: *P. viridiflava* (фаг 223-17) і *P. fluorescens* (фаг 7591-14). Спільною закономірністю було те, що при рестрикційному аналізі ДНК фагів, які розмножувались на pv. *tabaci*, наряду з мажорними, завжди спостерігали утворення додаткових міnorних фрагментів. При цьому, ДНК фагів не змінювали своєї довжини. У обох фагів на початку досліджень виявляли по два ідентичних за довжиною міnorних EcoRV фрагменти ДНК. При зміні хазяїна вони зникали. Після повернення до першого хазяїна у фагів знову виявляли мажорні HindIII фрагменти та раніше відсутні міnorні. У фага 7591-14 їх було два, а у фага 223-17 один. Походження міnorних EcoRV фрагментів ДНК, очевидно, пов'язано з виникненням додаткового сайту рестрикції, оскільки сума їх довжин дорівнювала розміру одного з мажорних фрагментів. Міnorні HindIII фрагменти, розміри яких дорівнювали сумі довжин двох або трьох мажорних фрагментів, навпаки, могли бути утворені, внаслідок втрати кількох сайтів рестрикції. Оскільки вплив на ДНК фаги ферментних систем хазяїна супроводжувався синхронною появою або втрагою міnorних фрагментів ДНК, то очевидно, цей процес не носить випадковий характер. Слабка люмінесценція міnorних фрагментів значної довжини вказує на те, що їх питома вага у загальному пулі ДНК невелика. Зміни, що спостерігали, очевидно, пов'язані з процесом адаптації фагів до різних хазяїв.

Ключові слова: *Pseudomonas syringae*, *P. savastanoi*, фаги, зміна хазяїв.

L.I. Semchuk, S.A. Romashev

Taras Shevchenko Kyiv National University

EFFECT OF HOST CHANGE ON PHAGES 223 -17 AND 7591-14 *PSEUDOMONAS SAVASTANOI PV. TABACI*

Summary

We studied the characteristics of phages 223-17 7591-14 grown on the strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, on the intermediate host of *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* and after their returning to original. It was found, that phages grown on pv. *phaseolicola* acquired ability to cause lysis of previously resistant strains *P. viridiflava* (phage 223-17) and *P. fluorescens* (phage 7591-14). It was common that, when making the restriction analysis of DNA of phages grown on pv. *tabaci*, the formation of additional minor fragments was observed along

with the major fragments. Phage DNA did not change its length then. Two minor EcoRV fragments of DNA identical by length, were found in both phages in the first studies. If they changed the host, they disappeared. Once again returning to the first host the authors found previously absent, additional minor HindIII fragments of DNA. The phage 7591-14 had two fragments, while the phage 223-17 had one fragment. Formation of minor EcoRV DNA fragments is obviously connected with the emergence of an additional restriction site, since the sum of their lengths is equal to the size of one of the major fragments. Minor HindIII fragments whose size was equal to the sum of the lengths of two and three major fragments could be formed as a result of the loss of several restriction sites. Since the effect of the host enzyme systems on phage DNA was accompanied by the synchronous acquisition or loss of minor DNA fragments, it is obvious that this process is not of a random nature.

Weak luminescence of the minor fragments of considerable length indicates that their part in the total pool of DNA is small. The observed changes of phages seem to be associated with the process of their adaptation to different hosts.

The paper is presented in Russian.

К е у о р д с: *Pseudomonas syringae*, *P. savastanoi*, phage, changing of hosts.

Т h e a u t o r ' s a d d r e s s: *Semchuk L.I.*, Educational and Scientific Centre «Institute of Biology», Taras Shevchenko Kyiv National University; 64/13 Volodymyrska St., Kyiv, 01033, Ukraine.

1. Андрійчук О.М., Семчук Л.І., Ромашев С.А та ін. Визначення термінів збереження популяцій фагів фітопатогенних бактерій. // Ветеринарна біотехнологія. – 2006. – 8. – С. 3–8.
2. Адамс М. Бактериофаги. – М.: Мир, 1961. – 527 с.
3. Семчук Л., Ромашев С. Бурхан Г. Взаємовплив антагоністів фага 8573sm та його хазяїна *Pseudomonas fluorescens* 8573 при їх експериментальній коеволуції. // Вісн. Київ. ун-ту. – 2012. – 58. – С. 18–21
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. – 430 с.
5. Семчук Л.И., Токарчук Л.В., Самойленко В.И., и др. Методы получения, концентрации и очистки бактериофагов, поражающих фитопатогенные бактерии рода *Pseudomonas*. // Пробл. общ. и молекул. биол. 1988. – 7. – С. 97–100.
6. Семчук Л.І., Степанова О.А., Бойко А.Л., Андрійчук О.М. Виявлення фагів фітопатогенних бактерій у зябрах риб Чорного моря. // Вісн. Київ. ун-ту. Біологія. – 2003. – 41. – С. 156–158.
7. Сфименко Т.В., Андрійчук О.М., Ромашев С.А. та ін. Швидке та ефективне виділення ДНК, чутливих до специфічних ендонуклеаз із фагів *Pseudomonas* та *Xanthomonas* // Вісн. Київ. ун-ту. Біологія. – 2001. – 35. – С. 13–16.
8. Arber W., Dussoix D. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. I. Host controlled modification of bacteriophage lambda // J. Mol Biol. – 1962. – N 5. – P. 18–36.
9. Bitinaite J., Schildkraut I. Self-generated DNA termini relax the specificity of SgrAI restriction endonuclease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – 99. – P. 1164–1169.
10. Crill W.D., Wichman H.A., Bull J.J. Evolutionary Reversals during Viral Adaptation to Alternating Hosts. // Genetics. – 2000. – 154, N 1. – P. 27–37.
11. Danovaro R., Dell'Anno A., Corinaldesi C., et al. Major viral impact on the functioning of benthic deep-sea ecosystems // Nature. – 2008. – 454. – P. 1084–1087.
12. Horvath P., Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea // Science. – 2010. – 327, N 5962. – P. 167–170.
13. Luria S.E., Human M.L. A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses // J. Bacteriol. – 1952. – 64, N 4. – P. 557–569.
14. Santos S.B., Fernandes E., Carvalho C.M., Sillankorva S., Krylov V.N., Pleteneva E.A., Shaburova O.V., Nicolau A., Ferreira E.C., Azeredo J. Selection and characterization of a multivalent *Salmonella* phage and its production in a nonpathogenic *Escherichia coli* strain // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – 76, N 21. – P.7338–7342.
15. Vos M., P. Birkett, E. Birch, et al. Local adaptation of bacteriophages to their bacterial hosts in soil // Science. – 2009. – 325, N 8, – P. 5942.

Отримано 16.10.2012