

ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГА ERWINIA AMYLOVORA PZ321

П. О. Прохорчик

Белорусский государственный университет, г. Минск;

polina.prohortchik@gmail.com;

науч. рук. – Н.В. Бесараб, ассист.

Аннотация: В ходе данной работы была проведена характеристика биологических и молекулярно-генетических свойств нового бактериофага *E. amylovora*. Для бактериофага проведено исследование способности к литической активности в отношении бактерий вида *Erwinia amylovora*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens*, *Pectobacterium carotovorum* и *Escherichia coli* В. Была выделена ДНК бактериофага, проведен ПЦР и ПДРФ-анализ геномной ДНК изолятов бактериофагов. Были получены микрофотографии фаговых частиц при помощи электронного микроскопа.

Ключевые слова: *Erwinia amylovora*; бактериальный ожог; фитопатогены; бактериофаги.

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальный ожог, вызываемый бактерией *Erwinia amylovora*, стал самой настоящей проблемой для владельцев груш, яблонь и других растений семейства Rosaceae. Опасная болезнь может уничтожить весь сад, поэтому бороться с ней нужно на начальном этапе. Первые случаи бактериального ожога были зафиксированы еще в XVIII веке[1]. За 150 лет болезнь распространилась по всему миру, и теперь ни один сад не защищен от нее. Бактерии-возбудители распространяются от больных деревьев к здоровым, особенно при умеренных температурах и высокой влажности. Причем поражаются как старые, так и молодые деревья [3].

На территории Беларуси бактериальный ожог плодовых культур был впервые зарегистрирован в 2007 году [2]. Для уменьшения распространения бактерии используют разные методы борьбы. В качестве биологического способа контроля бактериального ожога служат специфичные бактериофаги. На сегодняшний день получено достаточное количество изолятов бактериофагов способных заражать бактерии *E. amylovora*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На первом этапе работы был осуществлен поиск бактериофагов, способных лизировать клетки *E. amylovora*. Материалом для выделения бактериофага послужила почва под грушей. Исследуемый материал, в

количестве нескольких ложек, помещали в 60 мл пептонно-дрожжевой бульон с 2 мл ночной культуры бактерией *E. amylovora* 1/79Sm и инкубировали с аэрацией 18-24 ч при 28 °С. После лизиса культуры, оставшиеся бактериальные клетки удаляли. Далее обирали 2 мл образца и добавляли 50 мкл хлороформа, после центрифугировали 10 минут 13000 об/мин. После определяли титр бактериофага при помощи серийных разведений и последующего посева по методу Грация.

Спектр литического действия бактериофага оценивали по наличию зон лизиса на газоне чувствительной культуры бактерий при нанесении капли фаголизата. Положительные результаты проверяли при титровании бактериофагов методом Грация.

Для постановки ПЦР использовались праймеры, специфичные последовательностям геномов бактериофагов кафедры молекулярной биологии Loshitsa2 и Micant.

Рестрикционный анализ проводили с помощью рестриктаз EcoRI, HindIII, BamHI. Реакционные смеси помещались на водяную баню и инкубировались 1 час при соответствующей температуре. Полученные результаты визуализировались при помощи электрофореза в агарозном геле.

Для первичного исследования методом электронной микроскопии фаговые частицы были сконцентрированы высокоскоростным центрифугированием и окрашены 2% раствор уранилацетата. Фаговые частицы наблюдали в просвечивающий электронный микроскоп Hitachi H-800 в НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате работы, на территории Минской обл. Столбцовском р-на из образцов почвы под грушами выделен бактериофаг, активный в отношении бактерий вида *E. amylovora* 1/79Sm.

Выделенный бактериофаг на газоне индикаторной культуры формировал круглые, прозрачные негативные колонии различного размера (2–5 мм в диаметре) с мутным, нечетким краем. Многократные пассажи как крупных, так и мелких негативных колоний бактериофага приводили к одинаковому результату – формированию разнородных по размеру колоний. Результаты анализа представлены на рисунке 1.



Рис. 1. Негативные колонии бак-териофага PZ321

Для дальнейших исследований был получен фаголизат PZ321 с титром $1,909 \times 10^9$ БОЕ/мл.

Был исследован спектр литического действия, результаты представлены в таблице.

Спектр литического действия бактериофага

Бактерия	Штамм	Фаг PZ321	Бактерия	Штамм	Фаг PZ321
<i>E. amylovora</i>	1/79	+	<i>P. agglomerans</i>	194	+
	D4	+		197	—
	L 3-1	+		198	—
	L 3-8	+		208	+
	E2	+		216	+
	E3	+		219	+
	E4	+		220	+
	E5	+		221	—
	E10	+		222	—
	E19	+		228	—
<i>P. putida</i>		+		242	—
<i>S. marcescens</i>		—		245	+
<i>P. carotovorum</i>	jn42	+		246	+
<i>E. coli</i>	B	—			

Примечание. Подавление роста бактерий фагом обозначается знаком “+”, отсутствие наблюдаемого подавления роста – “-”.

Для данного бактериофага PZ321 исследовали литическую активность в отношении штаммов бактерии вида *E. amylovora*, *P. agglomerans*, *P. putida*, *S. marcescens*, *P. carotovorum* и *E. coli*. Результаты исследований показали, что бактериофаг PZ321 активен только в

отношении бактерий вида *E. amylovora*, *P. carotovorum*, *P. putida* и некоторых штаммов *P. agglomerans*. Остальные бактерии оказались устойчивы к бактериофагу.

Положительные результаты литической активности в отношении штаммов *E. amylovora* D4, *P. agglomerans*, *P. putida* и *P. carotovorum* требуют дальнейших исследований с помощью метода Грация.

На следующем этапе работы осуществлено выделение нуклеиновой кислоты из бактериофага PZ321.

В результате ПЦР-анализа с праймерами, специфичными к последовательностям геномов Loshitsa2 и Micant, можно предположить, что бактериофаг PZ321 является родственным бактериофагу Loshitsa2.

Для определения гетерогенности коллекции бактериофагов *E. amylovora* кафедры молекулярной биологии, был проведен ПДРФ-анализ геномов бактериофагов Loshitsa2 и нового бактериофага PZ321. Результаты анализа представлены на рисунке 2.

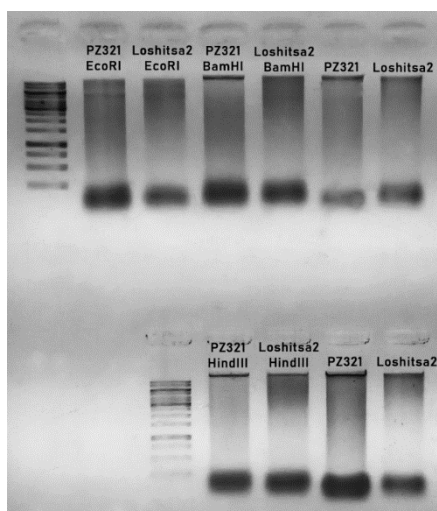


Рис. 2. Результаты реакции рестрикции ДНК

Было установлено, что ДНК-бактериофагов PZ321 и Loshitsa2 подвержены гидролизу эндонуклеазной рестрикции EcoRI. Для установления идентичности бактериофагов требуются дальнейшие исследования.

В результате первичных исследований методом электронной микроскопии было показано, что частица фага PZ321 представлен капсидом в виде икосаэдрической головки без длинного сократимого отростка, что типично группам по Брэдли А, В и С. Фаг PZ321 имеет размер около 50 нм. Результаты наблюдений представлены на рисунке 3.

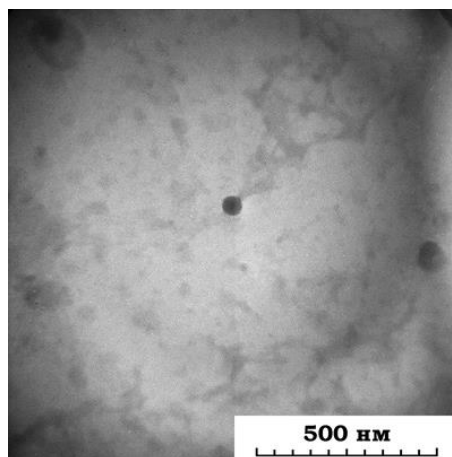


Рис. 3. Микрофотографии морфологии фаговых частиц, полученных на просвечивающем электронном микроскопе Hitachi H-800

Таким образом, в ходе проделанной работы, нами была проведена характеристика биологических и молекулярно-генетических свойств нового бактериофага *E. amylovora* PZ321.

Выражаем отдельную благодарность Моховикову Максиму Александровичу за предоставление возможности получения микрофотографий бактериофага при помощи электронного микроскопа (НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ).

Библиографические ссылки

1. Акимкин, В.Г. Бактериофаги: исторические и современные аспекты их применения. Опыт и перспективы / В.Г. Акимкин, О.С. Дарбеева, В.Ф. Колков // Клиническая практика. – 2010. – № 4. – 48–54.
2. Lagonenko, A.L., Komardina, V.S., Nikolaichik, Y.A. and Evtushenkov, A.N. (2008), First Report of *Erwinia amylovora* Fire Blight in Belarus. *Journal of Phytopathology*, 156: 638-640.
3. Turner, D., Kropinski, A. M., & Adriaenssens, E. M. (2021). A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses*, 13(3), 506. doi:10.3390/v13030506.