Investigation of genetic heterogeneity of phages from phytopathogenic bacteria *Xanthomonas phaseoli*

Orlovskaya P.I., Pilipchuk T.A., Girilovich N.I., Mandrik-Litvinkovich M.N., Kalamiyets E.I

Institute of Microbiology, NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

E-mail: orlovskapi@gmail.com

Key message. DNA of 8 *Xanthomonas phaseoli* bacteriophages were studied by restriction analysis using diverse endonucleases. Based on similarity of restricts the phages were divided into 4 groups.

Keywords: bacteriophages, phytopathogenic bacteria, restriction analysis

Bacteria *Xanthomonas phaseoli* are causal agents of bacterial blight in leguminous crops responsible for fading and decay of leaves, stems, degeneration of beans and seeds. Application of virulent bacteriophages is one of the methods to control phytopathogen infections of agricultural crops.

Eight phages XpP1, XpP2, XpP3, XpP4, XP1, Xp23, XpIK, XpD with specificity to indicator culture *Xanthomonas phaseoli* were isolated from various natural sources. One of the criteria characterizing bacteriophages is the size and number of DNA fragments resulting from the action of restrictases.

Aim of this research was investigation of genetic heterogeneity of *X. phaseoli* BIM-279 bacteriophages using restriction analysis.

Phage DNA samples were treated with endonucleases *HindII*, *HindIII*, *AvaI*, *HpaI* and *EcoRI* (Fermentas) during 1.5 h at 37°C according to the recommended protocol.

Analysis of results has revealed that the number of restricts varied from 1 to 12, and their size from 500 to 10 000 b p. Based in these data bacteriophages were divided into 4 main groups. The phages of the first group XpP1, XpP4, Xp23, XpD under the impact of endonucleases *HindII*, *AvaI*, *HpaI* formed the identical set of DNA fragments. In addition, DNA of these phages was not sensitive to the enzymes *EcoRI* and *HindIII*. The second group composed of phages XpP2, XpP3 also produced the similar DNA fragments upon treatment with restrictases *HindII*, *AvaI*, *HpaI* and was not susceptible to *EcoRI* and *HindIII* action. Groups 3 and 4 comprised one phage each, XpIK and XP1, respectively. DNA of phage XpIK exposed to restrictases *HindII* и *AvaI* yielded the set of restricts distinct from the phages of groups 1 and 2 and was not responsive to restrictases *HpaI*, *EcoRI* and *HindIII*. In turn, DNA of phage XP1 did not harbor restriction sites for any of the applied restrictases.

Summing up, comparison of the restriction profiles of isolated *X. phaseoli* BIM-279 bacteriophages led us to deduce that the examined phages are different in the genetic structure and may be further used as components of the consortium to control bacterial diseases of agricultural crops.

Изучение генетической гетерогенности бактериофагов фитопатогенных бактерий *Xanthomonas phaseoli*

Орловская П.И., Пилипчук Т.А., Гирилович Н.И., Мандрик-Литвинкович М.Н., Коломиец Э.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Аннотация. Методом рестрикционного анализа с использованием различных эндонуклеаз исследованы ДНК восьми бактериофагов *Xanthomonas phaseoli*. В результате фаги были разделены на четыре группы по схожести рестриков.

Ключевые слова: бактериофаги, фитопатогенные бактерии, рестрикционный анализ

Бактерии *Xanthomonas phaseoli* являются возбудителями обыкновенной пятнистости (бактериального ожога) бобовых культур и вызывают увядание и отмирание листьев, стеблей, недоразвитость бобов и семян. Одним из методов защиты сельскохозяйственных культур от бактериальных фитопатогенов является использование вирулентных бактериофагов.

Из различных природных источников было выделено 8 фагов XpP1, XpP2, XpP3, XpP4, XP1, Xp23, XpIK, XpD к индикаторной культуре *Xanthomonas phaseoli* BIM-279. Одним из критериев характеристики бактериофагов является размер и количество фрагментов их ДНК, образующихся под действием ферментов рестрикции.

Исходя из вышеизложенного, целью исследования являлось изучение генетической гетерогенности бактериофагов *X. phaseoli* BIM-279 с использованием рестрикционного анализа.

Фаговые ДНК обрабатывали эндонуклеазами *HindII*, *HindIII*, *AvaI*, *HpaI* и *EcoRI* (Fermentas) в течение 1,5 часа при 37°C согласно протоколу.

При анализе полученных результатов рестрикции было выявлено, что количество рестриков варьировало от 1 до 12, а их размер – от 500 до 10 000 п.н. На основании этих данных бактериофаги разделили на 4 основные группы. К первой группе отнесли фаги XpP1, XpP4, Xp23, XpD, ДНК которых под воздействием эндонуклеаз *HindII*, *AvaI*, *HpaI* формировала одинаковый набор фрагментов. Кроме того, ДНК данных фагов была нечувствительна к действию ферментов *EcoRI* и *HindIII*. Вторую группу составили фаги XpP2, XpP3, которые также давали сходные фрагменты ДНК после обработки рестриктазами *HindII*, *AvaI*, *HpaI* и не были восприимчивы к действию *EcoRI* и *HindIII*. Третью и четвертую группы включали по одному фагу XpIK и XP1, соответственно. ДНК фага XpIK при обработке рестриктазами *HindII* и *AvaI* образовывала набор рестриков, отличающий его от фагов первых двух групп, и была нечувствительна к рестриктазам *HpaI*, *EcoRI* и *HindIII*. В свою очередь, ДНК бактериофага XP1 не содержала сайтов рестрикции ни для одной из использованных рестриктаз.

Таким образом, сравнение рестрикционных профилей выделенных бактериофагов *X. phaseoli* BIM-279 позволило заключить, что фаги различны по генетической структуре и в дальнейшем могут быть использованы в составе консорциума для защиты сельскохозяйственных культур от бактериозов.