УДК 632.937.15:634.10

<https://doi.org/10.53040/gppb7.2021.88>

БАКТЕРИОФАГИ *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ПЕРСПЕКТИВНЫЕ В ПОДАВЛЕНИИ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО РАКА ПЛОДОВЫХ

Самойлова Анна

Институт генетики, физиологии и защиты растений, Кишинэу, Республика Молдова, e-mail: anna.samoilova@igfpp.md

Abstract

Five *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* bacteriophages were isolated from the quince, apple and pear. After a detailed study, the isolated bacteriophages could be used for biocontrol of the bacterial canker pathogen. One of the isolated phages was active against the causative agents of bacterial canker and fire blight.

Key words: bacterial canker, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora* bacteriophages

Введение

Возбудитель бактериального рака *Pseudomonas syringae* van Hall. может существенно снижать урожайность таких экономически важных культур как груша, яблоня и айва. В настоящее время известно около 60 патоваров этой бактерии, один из которых, *Ps. syringae* pv. *syringae*, инфицирует более 180 видов растений.

У плодовых, пораженных бактериальным раком распутившиеся весной листья внезапно увядают, скручиваются, засыхают и остаются долго висеть на дереве. Цветки, почки и не успевшие распуститься листья темнеют, засыхают и долго не опадают. На коре стволов у основания скелетных ветвей и на мелких ветвях образуются трещины [1].

Лучше всего патоген развивается при относительно низких температурах и высокой влажности [1, 10], поэтому особенно серьезный ущерб он наносит весной в период образования почек, что может привести к значительным потерям урожая.

Для борьбы с бактериальным раком используются агротехнические, химические и биологические средства. В качестве биологических средств защиты применяют грибы рода *Trichoderma* и бактерии *Bacillus subtilis*. Высокую эффективность в подавлении бактериального рака показал препарат «Пентафаг», разработанный в Республике Беларусь на основе пяти штаммов бактериофагов.

Преимущество бактериофагов как средства борьбы с бактериозами состоит в том, что они являются естественными компонентами экосистем, инфицируют только чувствительные к ним бактерии и нетоксичны для растений, животных и человека. Поэтому в последние десятилетия активно проводится поиск и выделение бактериофагов, вирулентных по отношению к возбудителям бактериозов. Известные к настоящему времени бактериофаги *Ps. syringae* pv. *syringae* относятся к семействам *Podoviridae*, *Myoviridae* и *Siphoviridae* [10,11, 8].

Целью работы было выделить бактериофаги *Ps. syringae* pv. *syringae* и отобрать наиболее перспективные для использования в биологической защите плодовых от возбудителя бактериального рака.

Материалы и методы

Материалом исследований были некротизированные ткани айвы, яблони и груши, собранные в период вегетационного сезона 2021 года. В качестве тест-бактерии использовали штамм *Ps. syringae* pv. *syringae* DSM 1241.

Бактериофаги *Ps. syringae* pv. *syringae* выделяли методом агаровых слоев [6]. Для культивирования бактерий и бактериофагов использовали твердую питательную среду LB (10 г/л пептон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 10 г/л NaCl, 15 г/л агар, 1л дистиллированная вода), среду Кинга Б (20 г/л пептон, 1.5 г/л K₂HPO₄, 1,5 г/л MgSO₄, 10 мл глицерин, 15 г/л агар, 1л дистиллированная вода), жидкую питательную среду LB (10 г/л пептон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 10 г/л NaCl, 1л дистиллированная вода), а также мягкую питательную среду LB с 0.7% концентрацией агара.

Результаты и обсуждение

Бактериофаги *Ps. syringae* pv. *syringae* выделяли из образцов растений с некрозами листьев, молодых побегов и плодов, а также из почвы в непосредственной близости от растений. Образцы собирали в садах яблони и груши в центральной и северной частях Республики Молдова, в яблоневом саду и на опытном участке айвы ИГФЗР. Для дальнейших исследований были отобраны изоляты бактериофагов, устойчивые к процессу выделения и культивирования в лабораторных условиях (Таблица 1).

Таблица 1. Изоляты бактериофагов *Ps. syringae* pv. *syringae*, выделенные в этом исследовании

№ изолята	Изолят	Растение-хозяин	Источник	Средний диаметр колонии лизиса, мм (ЛБ агар)
1	фPsCy1- s	<i>Cydonia oblonga</i> Mill.	почва	1.5-2
2	фPsM2- a	<i>Malus domestica</i> Borkh.	крона растения	1.0-1.5
3	фPsM3- a	<i>Malus domestica</i> Borkh.	крона растения	2 – 2.5, бляшки
4	фPsCy4- a	<i>Cydonia oblonga</i> Mill.	крона растения	1.5-2.0
5	фPsP5- a	<i>Pyrus communis</i> L.	крона растения	1.0-1.5

Бактериофаги, способные инфицировать клетки бактерий *Ps. syringae* pv. *syringae*, выделены из кроны основных экономически важных семечковых культур.

В надземных частях растений бактерии *Ps. syringae* pv. *syringae* часто присутствуют вместе с возбудителем бактериального ожога плодовых, бактерией *Erwinia amylovora*. В пробах, из которых выделяли патогенные штаммы *E. amylovora*, выявляли также и бактерии *Ps. syringae* pv. *syringae* [3, 2]. По данным казахстанских исследователей, из 1143 бактериальных изолятов, выделенных из диких и культурных плодовых, произрастающих на юге и юго-востоке Казахстана и сопредельной территории Кыргызстана, 38% были идентифицированы как патогенные бактерии *E. amylovora*, а 37% как *Ps. syringae* [2]. Эпифитные колонии *E. amylovora* и *Ps. syringae* pv. *syringae* были также обнаружены на сорняках в плодовых садах [7].

Таким образом, в насаждениях плодовых оба патогена занимают одну экологическую нишу, вызывают во многом сходные симптомы поражения, такие как усыхание листьев, цветков и побегов и адаптировались к одинаковым условиям среды обитания. Поэтому можно предположить, что существуют бактериальные паразиты, вирулентные по отношению к *E. amylovora* и *Ps. syringae* pv. *syringae* одновременно.

В ходе дальнейших исследований была проверена способность выделенных бактериофагов *Ps. syringae* pv. *syringae* инфицировать патогенные бактерии *E. amylovora*. В качестве тест-бактерий использовали штамм *E. amylovora* EaM9, выделенный нами в предыдущие годы из айвы и штамм *E. amylovora* CFBP 1430 (Таблица 2).

Таблица 2. Способность бактериофагов *Ps. syringae* pv. *syringae*, выделенных из различных растений-хозяев лизировать бактерии *E. amylovora*

Тест-бактерия	Изолят бактериофагов				
	фPsCy1- s	фPsM2- a	фPsM3- a	фPsCy4- a	фPsP5- a
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i> DSM 1241	+	+	+	+	+
<i>Erwinia amylovora</i> EaM9	-	-	-	+	-
<i>Erwinia amylovora</i> CFBP 1430	-	-	-	+	-

«+» наличие негативных колоний на бактериальном газоне; «-» отсутствие негативных колоний на бактериальном газоне

Видно, что один из выделенных нами изолятов обладает широким кругом хозяев, так как лизует бактерии из двух порядков: *Pseudomonadales* и *Enterobacterales*.

Природные штаммы бактериофагов с широким спектром литического действия появляются в процессе коэволюции бактериофагов и их бактериальных хозяев и встречаются достаточно часто. Так, выделены и охарактеризованы фаги, способные лизировать представителей двух классов бактерий-хозяев [9], идентифицирована группа близкородственных подовирусов, которые могут

заражать бактерий-хозяев из шести родов и трех порядков класса *Gammaproteobacteria* [4]. Считается, что бактериофаги с широким спектром литической активности играют ключевую роль в экологии фагов и в переносе генов в природе [9]. В настоящее время активно изучаются молекулярные и эволюционные механизмы, которые обуславливают специфичность бактериофагов по отношению к бактериальным хозяевам [5].

Фаги с широким кругом хозяев могут быть значительно эффективнее в подавлении бактериозов, чем узкоспециализированные. Выделенный нами изолят бактериофагов, способный инфицировать клетки *Ps. syringae* pv. *syringae* и *E. amylovora*, после детального изучения может быть использован в лечении и профилактике таких опасных болезней как бактериальный рак и бактериальный ожог.

Выводы

В результате проведенных исследований из кроны айвы, яблони, груши, и из почвы, собранной у стволов растений, выделены пять изолятов бактериофагов *Ps. syringae* pv. *syringae*. Изолят фPsCy4-а, способный лизировать одновременно клетки возбудителей бактериального рака плодовых и бактериального ожога плодовых может быть перспективным для фаготерапии этих бактериозов.

Исследования проведены в рамках проекта Государственной Программы 20.80009.7007.16 «Синергизм между природными факторами и экологически безвредными микробиологическими средствами регулирования плотности популяций вредителей для защиты сельскохозяйственных культур в традиционном и органическом сельском хозяйстве», финансируемой Национальным Агентством по Исследованиям и Развитию.

Литература

1. ГРИГОРЦЕВИЧ, Л.Н. Защита плодовых деревьев от болезней в садах интенсивного типа Учебное пособие для студентов специальности 1-75 02 01 «Садово-парковое строительство» Учреждение образования «Белорусский государственный технологический университет» Минск 2010 40 с.
2. ДЖАЙМУРЗИНА, А.А., ИСИН, М.М., УМИРАЛИЕВА, Ж.З., КОПЖАСАРОВ, Б.К. Установление этиологии возбудителя бактериального ожога на юге и юго-востоке Республики Казахстан. International Workshop «Fire blight: with special reference to ecological aspects and control measures», Almaty, 2016, p. 99-101. ISBN 978-601-7416-63-8.
3. ХАСАНОВ, Б.А., БАБАХАНОВА, М., МУХСИНОВ, Н. Бактериальный ожог плодовых культур в Узбекистане. International Workshop «Fire blight: with special reference to ecological aspects and control measures», Almaty, 2016, p. 44-50 . ISBN 978-601-7416-63-8.
4. CAZARES, D, CAZARES, A, FIGUEROA, W, GUARNEROS, G, EDWARDS, RA, VINUESA P. A Novel Group of Promiscuous Podophages Infecting Diverse Gammaproteobacteria from River Communities Exhibits Dynamic Intergenous Host Adaptation. mSystems. 2021;6(1):e00773-20. Published 2021 Feb 2. doi:10.1128/mSystems.00773-20
5. DE JONGE, PA, NOBREGA, FL, BROUNS, SJJ, DUTILH, BE. Molecular and evolutionary determinants of bacteriophage host range. Trends Microbiol. 2019 Jan;27(1):51-63. doi: 10.1016/j.tim.2018.08.006. Epub 2018 Sep 1. PMID: 30181062.
6. FORTIER, LC, MOINEAU, S. Phage production and maintenance of stocks, including expected stock lifetimes. Methods Mol Biol. 2009;501:203-19. doi: 10.1007/978-1-60327-164-6_19. PMID: 19066823.
7. GVOZDIK, RI, LUKACH, MI. Epifitna faza *Erwinia amylovora* та *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* na bur'ianakh plodovykh sadiv [Epiphytic phase of *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on orchard weeds]. Mikrobiol Z. 2001 May-Jun;63(3):43-50. Ukrainian. PMID: 11785263.
8. JAMES, S L, RABIEY, M, NEUMAN, B W, PERCIVAL, G, & JACKSON, RW.. Isolation, characterisation and experimental evolution of phage that hchestnut tree pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. Current microbiology. 2020, 77(8), 1438–1447. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01952-1>
9. JENSEN, EC, SCHRADER, HS, RIELAND, B, THOMPSON, TL, LEE, KW, NICKERSON, KW, KOKJOHN, TA. 1998. Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol 1998, 64:575–580. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.575-580> .
10. PINHEIRO, LAM, PEREIRA, C, FRAZÃO, C, BALCÃO, VM, ALMEIDA, A. Efficiency of Phage φ6 for Biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: An in Vitro Preliminary Study. Microorganisms. 2019, 7, 286. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090286>
11. RABIEY, M, ROY, SR, HOLTAPPELS, D, FRANCESCHETTI, L, QUILTY, B J, CREETH, R., SUNDIN, GW, Wagemans J, Lavigne R, & Jackson RW. Phage biocontrol to combat *Pseudomonas syringae* pathogens causing disease in cherry. Microbial biotechnology. 2020, 13(5), 1428–1445. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13585>