

5. Коваленко Т.А., Перминова Л.В., Чуенко Т.В. Углеродсодержащие макроструктурированные керамические носители для адсорбционной иммобилизации ферментов микроорганизмов. Иммобилизация нерастущих клеток дрожжей и растущих алканотрофных родококков // Биотехнология. – 2006. – № 1. – С. 76–83.
6. Курдиш И. К. Гранулированные микробные препараты для растениеводства. – Наука и практика КВЦ. – Київ. – 2001. – 142 с.
7. Курдиш И.К., Хенкина Л.М., Малащенко Ю.Р., Бавина Е.Н. Шахтные сточные воды как основа питательной среды для метаноокисляющих бактерий при микробиологическом методе понижения метаноносности угля // Микробиол. журн. – 1980. – 42, № 4. – С. 420–427.
8. Пат. 54923 України, Штам *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 для одержання бактеріального препарату для рослинництва / Курдиш І.К., Рой А.О. Опубл. 17.03.2003. – Бюл. № 3.
9. Потехина Н. В. Тейхоевые кислоты актиномицетов и других грамположительных бактерий // Успехи биологической химии. – 2006. – 46. – С. 225–278.
10. Рой А. А., Яценко И. П., Гордиенко А. С., Курдиш И.К. Свойства *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 и его стрептомицинустойчивого штамма // Прикл. биохимия и микробиол. – 2011. – 47, № 1. – С. 23–25.
11. Унифицированные методы анализа вод / Под ред. Ю.Ю. Лурье. – М: Химия, 1971. – 207 с.
12. Хіміч В.В., Хіміч О.В., Мельник В. Я. Сапоніт і комплексна вітамінно-мінеральна добавка в раціонах молочних корів // Корми і виробництво. – Київ: Аграрна наука, 2001. – 47. – С. 273–274.
13. Чоботарьов А.Ю., Гордієнко А.С., Самчук А.І., Курдиш І.К. Вплив діоксиду кремнію і сапоніту на ріст *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 // Микробиол. журн. – 2010. – 72, № 4. – С. 33–39.
14. Fletcher M. Effect of solid surfaces on the activity of attached bacteria // Bacterial adhesion. – New York, London: Plenum Press, 1985. – P. 326–339.
15. Graham L. L., Beveridge T. J. Structural differentiation of the *Bacillus subtilis* 168 cell wall // J. Bacteriol. – 1994. – 176, N 5. – P. 1413–1421.
16. James A. M. The electrical properties and topochemistry of bacterial cells // Adv. Colloid. And Interface Sci. – 1982. – 15, N 3–4. – P. 429–438.
17. Murray H. H. Applied clay mineralogy. – Amsterdam: Oxford: Elsevier, 2007. – 188 p.

Отримано 21.11.2012

УДК 578.4:578.81:579.842.1/2

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

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

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ И РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИОФАГОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ АЙВЫ И ГРУШИ С СИМПТОМАМИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА

С помощью электронной микроскопии и рестрикционного анализа, а также электрофореза частиц в агарозе и определения круга бактерий-хозяев исследованы фаговые популяции изолятов из айвы и груши, пораженных бактериальным ожогом. Изолят из айвы (рМА₁) содержит не менее трех фаговых популяций и двух фаговых вариантов, которые определяются на различных бактериальных индикаторах. При титровании этого изолята на *Erwinia amylovora* обнаружен бактериофаг КЕУ, В1-морфотипа с размером генома 82,4 кб. Изолят рМА₁ включает также оригинальную фаговую популяцию 4*, которая может быть обнаружена на индикаторной бактерии *Rantoea agglomerans* (Pag) g150. Две аналогичные популяции, входящие в состав изолята рМА₁, которые представлены близкими фаговыми вариантами с почти одинаковыми узорами HpaI-рестрикции, выявляются с помощью Pag g157 и 9/7-1. Аналогичная ситуация наблюдается и в случае фагового изолята из груши, рМГ. Три его популяции, выявленные на трех разных индикаторах, представляют один и тот же фаг С1-морфотипа (ТТ10-27) с размером генома 71,4 кб. В этом же изоляте с помощью индикатора *R. agglomerans* 9/7-2 обнаружено не менее двух других фаговых популяций.

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

Разработана модельная система, которая позволяет максимально эффективно проанализировать разнообразие изолятов, отобранных из растений, пораженных бактериальным ожогом, на наличие в них различных фаговых популяций и фаговых вариантов. Эта модельная система предусматривает собой использование трех индикаторных энтеробактерий *E. amylovora*, *Erwinia "horticola"* и *P. agglomerans*, тесно ассоциированных с растениями, а также игнорирование процедуры клонирования фагов.

Ключевые слова: бактериальный ожог, энтеробактерии, бактериофаги, электронная микроскопия, рестрикционный анализ геномов.

Бактериофаги фитопатогенных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, по сравнению с таковыми энтеробактерий, ассоциированных с животными и человеком, изучены недостаточно. Очевидно, что расширение поиска и описание новых фагов фитопатогенных микробов, а также детальное сравнение бактериальных вирусов, могли бы привести к нахождению важных отличительных характеристик систем фаг-бактерия, свойственных для двух близких групп энтеробактерий, занимающих принципиально разные экологические ниши.

Вследствие перспективности практического использования в качестве антимикробных агентов к настоящему времени наибольшее количество бактериофагов обнаружено и охарактеризовано у такой важной фитопатогенной энтеробактерии как *Erwinia amylovora* [9]. Кроме того, недавно началось интенсивное исследование фагов двух общеизвестных подвидов фитопатогена *Pectobacterium carotovorum – carotovorum* [8] и *atrosepticum* [14]. Определенный интерес вызывают также фаговые системы вездесущей энтеробактерии *Pantoea agglomerans* [6], которая, как эпифит, тесно ассоциирована со многими растениями.

С научной точки зрения интерес могут вызвать те бактериофаги, которые способны преодолевать межвидовые барьеры и вызывать инфекционный процесс у филогенетически отдаленных бактерий. Например, как было показано недавно, поливалентный фаг FE44 способен обуславливать продуктивную инфекцию у многих видов энтеробактерий, а также других грамтрицательных бактерий [4]. Поэтому его детальные молекулярно-генетические исследования могут пролить свет на многие ключевые моменты фаг-клеточных взаимоотношений и филогении бактериальных вирусов. Кроме этого фага, немаловажное значение могут иметь поливалентные фаги, инфицирующие представителей различных родов энтеробактерий, которые ассоциированы исключительно с древесными растениями. Такие фаги были обнаружены многими исследователями [7, 9, 12, 13], в том числе и авторами настоящей статьи [5]. Представленное сообщение будет касаться как разнообразия, так и уникальности поливалентных фагов, имеющих отношение к инфекции бактериального ожога таких плодовых деревьев как айва и груша, и лизирующих два рода бактерий *Erwinia* spp. и *P. agglomerans*.

Материалы и методы. В качестве индикаторных для фагов применяли два штамма *Erwinia amylovora* (*Eam*): K8 и J14; шесть штаммов *Erwinia "horticola"* (*Eho*): 43I, 43II, 60-1n, 60-3m, 23a и 120, а также четыре штамма *Pantoea agglomerans* (*Pag*): g157, g150, 9/7-1 и 9/7-2. Происхождение этих штаммов и их авторы указаны в предыдущей статье [5].

В работе использовали фаговые изоляты, полученные из материала, пораженного бактериальным ожогом (подсохшие почки, сухие листья, ветки), частично описанные в [5]. Повторное выделение бактериофагов было проведено из указанных мест поражения айвы, груши, яблони и боярышника в Ужгородском районе Закарпатской области после завершения зимней инкубации патогена *E. amylovora*. Экстракция фагов, как и в предыдущей работе, была осуществлена в жидкую среду (500 мг материала на 3 мл LB), в течение не более 18 часов при 4° С. Негативным контролем служили экстракты нативного материала без явных симптомов ожога.

Эксперименты проводили, используя стандартные фаговые методы, описанные нами ранее [1, 2, 3].

Бактериофаги были получены стандартным методом слитного лизиса или методом задержки лизиса. В последнем случае бактериальную культуру выращивали с интенсивной аэрацией в LB-среде до концентрации $2-3 \times 10^9$ клеток/мл, затем клетки заражали соответствующим фагом с множественностью 2. После 30 мин инкубации следующая порция того же фага была добавлена в суспензию в количестве, необходимом для достижения множественности заражения 4. Полный лизис наступал после продления культивирования около 4 часов с последующим перенесением суспензии на 18 часов в условия холода, 4–6 °С.

Концентрирование фагов, очистка фаговых частиц, выделение фаговых ДНК и их рестрикционный анализ с помощью эндонуклеазы HpaI, электрофорез в агарозных гелях, электронная микроскопия были проведены как описано в [1, 3].

Результаты. Электрофорез частиц различных фаговых изолятов показал, что в большинстве случаев они имеют близкие значения подвижности в геле агарозы. Для восьми фаговых изолятов этот показатель составил от 1,18 до 1,30 по сравнению с частицами фага Т4, подвижность которых принимали за единицу (рис. 1, табл. 1). На базе данного показателя все исследуемые фаги можно разделить на три группы. К первой группе относятся фаги, представленные популяциями VI, III, IV, 1* и 4*, подвижность которых составляет 1,24 – 1,27. Во вторую группу можно включить три фаговые популяции 2*, 3* и 5* с более низким значением подвижности в агарозе – от 1,18 до 1,23. Третью группу представляет фаговый изолят 6*, который, скорее всего, представлен двумя дискретными популяциями частиц, подвижности которых значительно больше, чем представителей первых двух групп, и составляют 1,35 и 2,09 единиц.

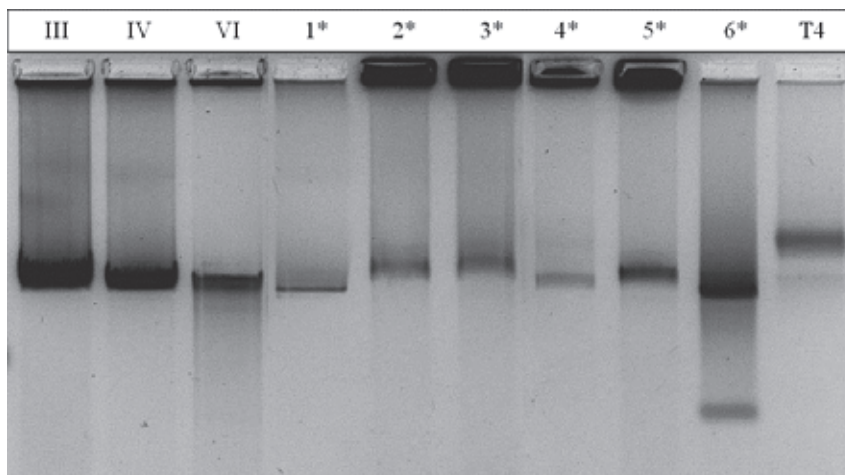


Рис. 1. Электрофореграмма фаговых частиц в 0,9 % геле агарозы, разделенных при напряженности поля 6,25 В/см на протяжении 4 час. Сверху указаны номера фаговых популяций

Таким образом, результаты, полученные с помощью простого анализа электрофоретической подвижности частиц в геле агарозы, свидетельствуют о большом разнообразии фагов в изолятах из груши и айвы, пораженных бактериальным ожогом.

Таблица 1

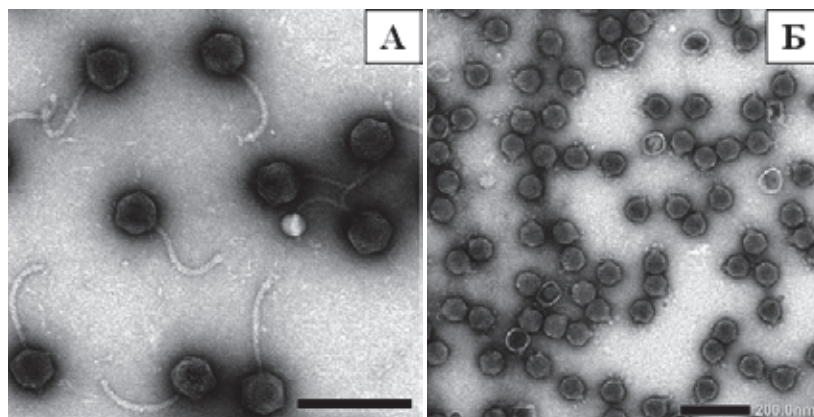
Электронно-микроскопические параметры частиц и характер рестрикции ДНК фагов из различных популяций

Фаговая популяция*	Подвижность** (ед.)	Электронная микроскопия частиц			Прототип узора рестрикции
		Морфотип	Диаметр головки (нм)	Длина отростка (нм)	
VI [рМА/К8]	1,28	B1	82	189	КЕУ
III [рМГ/60-1n]	1,24	C1	71	–	ТТ10-27
IV [рМГ/43II]	1,27	C1	71	–	ТТ10-27
1* [рМГ/ g157]	1,30	C1	68	–	ТТ10-27
2* [рМА./g157]	1,19	B1	65	178	2*
3* [рМА./g157]	1,18	B1	65	168	2*
5* [рМА./9/7-1]	1,23	B1	66	186	2*
4* [рМА./g150]	1,27	B1	64	160	4*
6*(1) [рМГ/9/7-1]	1,35	B1	58	167	6*
6*(2) [рМГ/9/7-1]	2,09	–	–	–	–

Примечание: «*» – здесь и в табл.2 в квадратных скобках приведено название изолята; через косую линию – наименование штамма, на котором проводили изолирование и препаративное получение фаговых частиц; «**» – подвижность частиц в геле агарозы выражена через подвижность фага Т4, которая условно принята за единицу; «–» – означает, что данные не получены.

Полное подтверждение данных электрофореза вирионов было получено с помощью электронной микроскопии. Оказалось, что размер фаговых частиц коррелирует с их подвижностью.

тью и что фаговая популяция VI из первой группы представлена гомогенными частицами фага семейства *Siphoviridae* (морфотип В1) с диаметром головки и длиной хвостового отростка 82 и 189 нм соответственно (рис. 2, А; табл.1). Три другие популяции из этой группы (III, IV и 1*) также представлены гомогенными фаговыми частицами, которые могут быть отнесены к семейству *Podoviridae* (морфотип С1). Все эти частицы имеют диаметр около 70 нм и сложно организованный короткий хвостовой отросток (рис. 2, Б; табл. 1). Оценочные размеры фаговых частиц из трех фаговых популяций 2*, 3* и 5* второй группы подвижности составляют приблизительно 65 – 66 нм для диаметра капсида и от 168 до 186 нм для длины хвостового отростка. Все эти фаги отнесены к семейству *Siphoviridae* и характеризуются морфотипом В1. Как указано выше, частицы из фаговой популяции 4* имеют подвижность, близкую к таковой фаговой группы 1. Однако, эти частицы характеризуются принципиально другими параметрами В1-вириона – 63,8 и 160 нм для диаметра головки и длины отростка, соответственно (табл. 1). Что касается фаговой популяции 6*, то в препаратах нам удалось обнаружить только фаговые В1-частицы, которые соответствуют электрофоретической подвижности 1,35 единиц и имеют линейные размеры 57,9 и 167 нм для капсида и хвостового отростка соответственно (рис. 3, А). Для определения типа частиц, формирующих полосу с подвижностью 2,09, почти эквимолярную к предыдущей (рис. 1, дорожка 6*), необходимы дополнительные исследования.



**Рис. 2. Электронограммы частиц фагов KEU (А) и TT10-27 (Б).
Масштабные линии – 200 нм**

В контексте морфолого-структурной организации исследованные нами фаги представляют определенный интерес. Мы обратили внимание на то, что при наличии большой головки основной представитель популяции VI имеет очень тонкий хвостовой отросток (рис. 1, А), длина которого только в 2,13 раза превышает диаметр капсида. Это, очевидно, влияет на его конформацию при определенных манипуляциях с фаговыми частицами (рис. 1, А). В независимых исследованиях удалось обнаружить, что отросток часто отрывается от капсида, дестабилизируя весь вирион. Интересным является также устройство коротких неконусовидных отростков фагов, обнаруженных в популяциях III, IV и 1* (рис. 2, А), а также фибрилл, обрамляющих этот отросток, которые часто видны на микрофотографиях в виде отдельных веретеноподобных образований. Весьма оригинальной можно считать структурную организацию хвостового отростка фага, обнаруженного в изоляте 6* (рис. 3, Б). Этот отросток имеет хорошо выраженную дистальную часть, в состав которой входит сложная клиновидная базальная пластинка. В дополнение к этому, расположение субъединиц отростка образует явную перекрестную исчерченность, в отличие от поперечной исчерченности, свойственной для хвостовых отростков подавляющего большинства фагов *Siphoviridae* и сократимых чехлов фагов *Myoviridae*. Недавно эта особенность была отмечена у фагов-гномов, небольших вирусов бактерий с сократимыми хвостовыми отростками [8], однако, трехмерная организация такой структуры пока остается непонятной.

Как видно из рис. 4, А, применение очистки фаговых частиц с помощью дифференциального центрифугирования и последующее выделение из них ДНК являются вполне удовлетво-

рительными для проведения рестрикционного анализа геномов. Однако, для точной оценки полиморфизма рестрикционных фрагментов и вычисления как длины отдельных фрагментов, так и суммарной длины фаговой ДНК, необходима тщательная очистка вирионов, например, в градиенте хлористого цезия (рис. 4, Б и В).

Оба подхода позволили установить, что, во-первых, рестрикционные узоры основных представителей фаговых популяций VI, 4* и 6* являются абсолютно уникальными и, во-вторых, имеются две группы изолятов, каждая из которых содержит по три идентичных фаговых популяции. Как видно из рис. 4, А, рестрикционные узоры фаговых популяций 2*, 3* и 5* идентичны, и эти популяции представляют два изолята из айвы (рМА₁ и рМА₂). Не исключено, что при культивировании этих изолятов на разных штаммах *P.agglomerans* g157 и 9/7-1 указанные фаги незначительно изменили узоры рестрикции ДНК (на рис. 4, А отсутствие и наличие определенных фрагментов отмечено стрелками – дорожка 2*). Вторая группа представлена одним изолятом, полученным из груши (рМГ), и включает однотипные фаговые популяции III, IV и 1*, которые представлены однородным фагом *Podoviridae* (рис. 2, Б). Однородность фаговых частиц дополняется также однозначными узорами HpaI-рестрикции (рис. 4, Б). В этом случае, а также в случае однородной фаговой популяции VI (рис. 2, А и рис. 4, В) можно, скорее всего, считать, что они представлены чистыми линиями фагов, которые были названы ТТ10-27 и КЕУ соответственно (табл. 1). У обоих фагов наблюдается однозначная корреляция между средним размером капсида (70,9 нм для ТТ10-27 и 82,7 нм для КЕУ) и длиной вирионной ДНК, полученной на основании HpaI-рестрикции (71,4 и 82,4 кб для фагов ТТ10-27 и КЕУ соответственно). Так как эти фаги не были специально получены с помощью клонирования [5], мы не исключаем наличия других фаговых линий в их составе, для выявления которых необходимо применение оригинальных биологических и генетических методов. Предварительное использование нами фагоустойчивых бактериальных мутантов показало, что такая возможность действительно не исключается для всех фаговых популяций, представленных в данном исследовании.

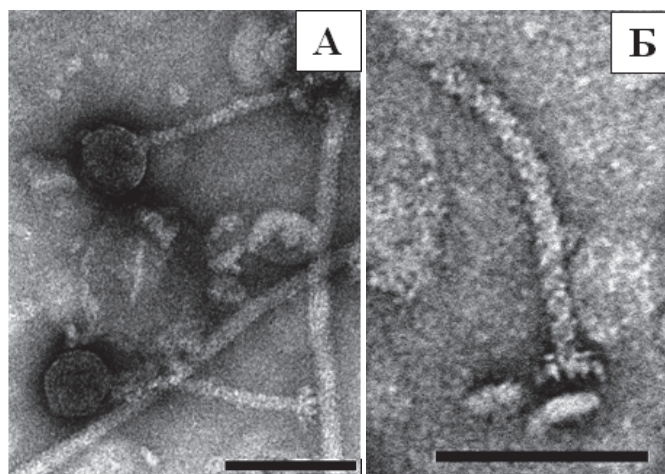


Рис. 3. Электронограммы фаговых частиц из популяции 6*. А – фаговые вирионы, Б – отдельный хвостовой отросток. Масштабные линии – 100 нм

В завершение исследований был определен круг хозяев для всех фагов девяти фаговых популяций с применением штаммов *P. agglomerans*, *E. "horticola"* и *E. amylovora*, а также частоты инфицирования этих бактерий соответствующими вирусами. Результаты этих опытов представлены в табл. 2. Они подтвердили данные электрофореза частиц в агарозе, электронномикроскопических исследований и рестрикционного анализа. В этом случае фаг КЕУ действительно представлен уникальным характером лизиса использованных индикаторов, инфицируя их с частотой 0,75. Этот фаг оказался специфичным относительно штаммов *E. amylovora* и амиловороподобных бактерий *E. "horticola"*. Два варианта фага ТТ10-27 и его аналог из популяции 1* имеют аналогичных хозяев, проявляя специфичность к *P. agglomerans*; они способны размножаться на трех штаммах *E. "horticola"* (табл. 2).

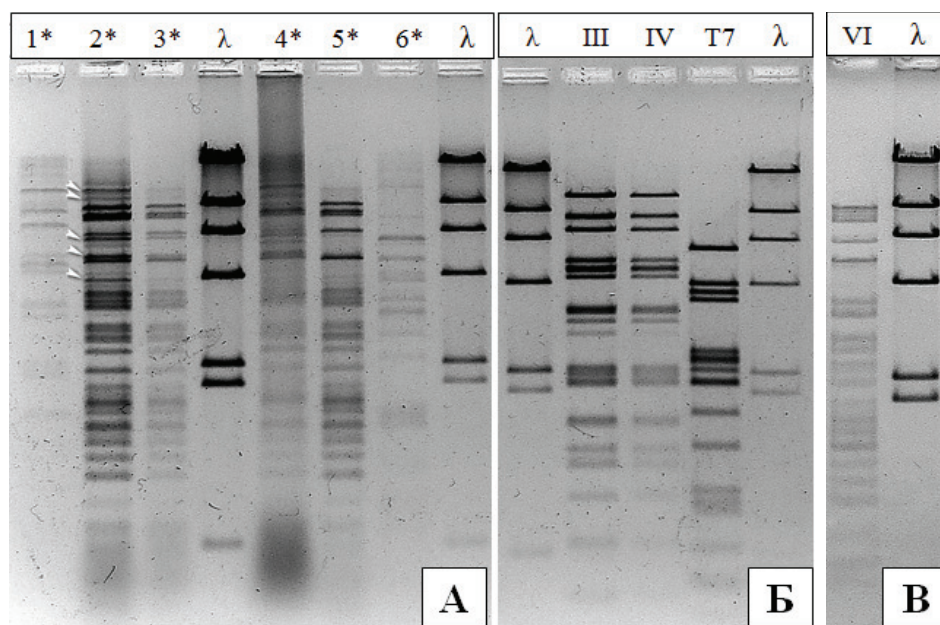


Рис. 4. Электрофореграммы фрагментов HpaI-рестрикции. (А) ДНК фагов популяций 1*, 2*, 3*, 4*, 5* и 6*. Стрелками указаны несовпадающие фрагменты (их отсутствие или наличие в популяциях 2*, 3* и 5*). (Б) HpaI-рестрикция ДНК фага ТТ10-27 (популяция III и IV). (В) Узор HpaI-фрагментов ДНК фага КЕУ (популяция VI). В качестве стандартов длины использованы фрагменты ДНК фага λ, полученные с помощью ее гидролиза эндонуклеазой HindIII

Таблица 2

Фагочувствительность и частота инфицирования (f) штаммов *P. agglomerans* (Pag), *E. "horticola"* 60 (Eho) и *E. amylovora* (Eam)

Фаговая популяция	Pag				Eho					Eam	f
	g157	g150	9/7-2	9/7-1	43П	43I	60-1n	60-3m\120	23a	K8/L4	
VI [pMA ₁ /K8]	+	+	-	ЕНК	+	+	+	+	+	+	0,75
III [pMG/60-1n]	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	0,58
IV [pMG/43П]	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	0,58
1* [pMG/g157]	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	0,50
2* [pMA ₂ /g157]	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	0,83
3* [pMA ₁ /g157]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,00
5* [pMA ₁ /9/7-1]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,00
4* [pMA ₁ /g150]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,00
6* [pMG/9/7-1]	+	+	+	+	ЕНК	-	ЕНК	-	-	-	0,33

Примечание: «ЕНК» – означает наличие единичных негативных фаговых колоний; «+» – мутные негативные колонии или пятна лизиса; «-» – негативных колоний не обнаружено.

Частота инфицирования бактерий этими фагами составляет 0,50 – 0,58. Популяции 2*, 3*, 4* и 5* представлены фагами, которые являются малоспецифичными в отношении исследованных бактерий и способны к максимальному проявлению поливалентности, лизируя от 83 до 100 % штаммов Pag, Eho и Eam. Наконец, основной представитель фаговой попу-

ляции 6* является наиболее специфичным бактериофагом, способен размножаться только на штаммах *P. agglomerans* и, по сравнению с остальными фагами, имеет наименьшую частоту инфицирования, составляющую всего 33 %. Очевидно, что его особая специфичность непосредственно связана с необычным строением прикрепительного аппарата (рис. 3, Б), который утилизирует очень специфичный рецептор, имеющийся только у *P. agglomerans*, при взаимодействии фага с клеткой. Интересно, что нанесение препаратов 6* и VI (а также фага КЕУ) на некоторые бактериальные газоны и последующее их культивирование приводят к образованию отдельных негативных фаговых колоний (ЕНК – табл. 2). Эти колонии однозначно свидетельствуют о наличии дополнительных фаговых линий в составе данных изолятов и, соответственно, об огромном разнообразии фаговых видов или гетерогенности фаговых популяций как общебиологическом свойстве природных бактериально-фаговых систем.

Таким образом, применение четырех независимых методов: электрофореза фаговых частиц в агарозе, электронной микроскопии, рестрикционного анализа и определения круга хозяев позволило идентифицировать и изучить фаги двух изолятов из айвы и одного из груши, пораженных бактериальным ожогом, и показать их разнообразие на популяционном уровне.

Обсуждение результатов. При всех современных достижениях, включая обширный прогресс геномики и метагеномики вирусов бактерий [10, 11], многие фундаментальные вопросы бактериофагии остаются неразрешенными. До сих пор неизвестна природа и происхождение бактериофагов, малоизвестны механизмы появления фагов в конкретном окружении, непонятно, как формируются их популяции и насколько они гетерогенны, достоверно не оценен их вклад в обмен генетической информацией между бактериями-хозяевами и др.

В предыдущей статье [5] мы показали, что первичная популяция фага, которая изолирована из соответствующей экологической ниши, является гетерогенной и содержит различные фаговые варианты. С другой стороны, первичный изолят может также быть гетерогенным и включать в себя различные фаговые популяции. В этой работе с помощью строго доказательных методов электронной микроскопии и рестрикционного анализа, а также сопровождающих их методов электрофореза частиц в агарозе и определения круга бактерий-хозяев, мы доказали эти два положения для фаговых изолятов из популяций айвы и груши, пораженных бактериальным ожогом. Один изолят из айвы (рМА₁), как оказалось, содержит не менее трех фаговых популяций и двух фаговых вариантов, которые определяются на различных бактериальных индикаторах. При титровании этого изолята на *E. amylovora* мы обнаружили фаговую популяцию VI (табл. 1 и 2), которая включает в себя бактериофаг КЕУ со сравнительно большим размером генома – 82,4 кб. Этот изолят включает в себя также оригинальную фаговую популяцию 4*, которая может быть обнаружена на индикаторной бактерии *P. agglomerans* g150. Две аналогичные популяции, входящие в состав изолята рМА₁, 3* и 5* (табл. 1 и 2), которые, скорее всего, представлены близкими фаговыми вариантами с почти одинаковыми узорами HpaI-рестрикции (рис. 4, А), выявляются с помощью *P. agglomerans* g157 и 9/7-1. На индикаторном штамме *Pag* g157 определяется подобный вариант фага 2*, характерный для изолята рМА₂ (табл. 1 и 2; рис. 4, А). Аналогичная ситуация наблюдается и в случае фагового изолята из груши (рМГ). Как видно из данных табл. 1 и 2, три популяции этого изолята, полученные на трех индикаторных культурах *E. "horticola"* 60-1n и 43II и *P. agglomerans* g157, представлены, скорее всего, одним и тем же фагом (ТТ10-27) с размером генома 71,4 кб. В этом же изоляте с помощью индикатора *P. agglomerans* 9/7-2 мы находим не менее двух фаговых популяций (по данным электрофореза частиц – рис. 1), одна из которых представлена фагом *Siphoviridae* с необычным хвостовым отростком (рис. 3).

Таким образом, разработанная нами модельная система, предусматривающая использование трёх индикаторных энтеробактерий *E. amylovora*, *E. "horticola"* и *P. agglomerans*, тесно ассоциированных с растениями, а также игнорирование процедуры клонирования фагов на первичных этапах их выделения [5], позволяет с максимальной эффективностью проанализировать разнообразие изолятов на наличие в них различных фаговых популяций и фаговых вариантов.

С другой стороны, эта система могла бы позволить проведение оперативной оценки патогенного процесса с участием *E. amylovora*. По нашим предварительным данным, массовый выход фагов сопровождается «процветанием» патогена в данной экологической нише. Предпри-

нимаемые в ходе выполнения данной работы неоднократные попытки получить фаги после угасания бактериального ожога или при анализе нативных (контрольных) образцов успеха не имели.

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

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного 154, Київ, МСП, Д 03680, Україна*

ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ І РЕСТРИКЦІЙНИЙ АНАЛІЗ БАКТЕРІОФАГІВ, ІЗОЛЬОВАНИХ З АЙВИ ТА ГРУШІ З СИМПТОМАМИ БАКТЕРІАЛЬНОГО ОПІКУ

Резюме

За допомогою електронної мікроскопії та рестрикційного аналізу, а також електрофорезу часток в агарозі і визначення кола бактерій-хазяїв досліджені фагові популяції ізолятів з айви та груші, уражених бактеріальним опіком. Ізолят з айви (рМА₁) містить не менше трьох фагових популяцій та двох фагових варіантів, що виявляються на різних бактеріальних індикаторах. При титруванні цього ізоляту на *Erwinia amylovora* було знайдено бактеріофаг KEY, B1-морфотипу з розміром генома 82,4 кб. Ізолят рМА₁ містить в собі також оригінальну популяцію 4*, яка може бути виявлена на індикаторній бактерії *Pantoea agglomerans* (Pag) g150. Дві аналогічні популяції, що входять до складу ізоляту рМА₁ і представлені близькими фаговими варіантами з майже однаковими узорами HpaI-рестрикції, виявляються за допомогою Pag g157 і 9/7-1. Аналогічна ситуація спостерігається і у випадку фагового ізоляту з груші рМГ. Три його популяції, виявлені на трьох різних індикаторах, являють собою єдиний фаг C1-морфотипу (TT10-27) з розміром генома 71,4 кб. У цьому ж ізоляті, за допомогою індикатора *P. agglomerans* 9/7-2 виявлено не менше двох інших фагових популяцій.

Розроблена модельна система, що дозволяє максимально ефективно проаналізувати різноманіття ізолятів, відібраних з рослин, уражених бактеріальним опіком, на наявність в них різних фагових популяцій та фагових варіантів. Ця модельна система передбачає використання трьох індикаторних ентеробактерій *E. amylovora*, *Erwinia "horticola"* та *P. agglomerans*, тісно асоційованих з рослинами, а також ігнорування процедури клонування фагів.

Ключові слова: бактеріальний опік, ентеробактерії, бактеріофаги, електронна мікроскопія, рестрикційний аналіз геномів.

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

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

ELECTRON MICROSCOPY AND RESTRICTION ANALYSIS OF BACTERIOPHAGES ISOLATED FROM QUINCE AND PEAR WITH SYMPTOMS OF FIRE BLIGHT

S u m m a r y

Phage populations of isolates from quince and pear affected with fire blight disease were studied using electron microscopy, restriction analysis and both agarose gel electrophoresis of particles and host range scoping method. The isolate from quince (pMA₁) comprises at least three phage populations and two phage variants that can be detected on different bacterial indicators. After titration of this isolate on *Erwinia amylovora* the bacteriophage KEY of B1 morphotype with the genome size of 82.4 kb was identified. The isolate pMA₁ also includes a unique phage population 4*, which can be identified on the test bacteria *Pantoea agglomerans* (Pag) g150. Two analogous populations being also present in the isolate pMA₁ that appeared to be close phage variants with almost identical HpaI-restriction patterns can be identified using Pag g157 and 9/7-1. The situation is similar in the case of phage isolates from pear, pMG. Three phage populations identified in it using three different indicators represent the same phage of C1 morphotype (TT10-27) with a genome size of 71.4 kb. At least two other phage populations were also detected in the same isolate using *P. agglomerans* 9/7-2 as an indicator.

A model system allowing the most efficient analysis of the isolates for the presence of different phage populations and phage variants in plants infected by fire blight disease has been developed. It provides for using three indicator enterobacterial species closely associated with the plants: *E. amylovora*, *Erwinia "horticola"* and *P. agglomerans* and ignoring of the phage cloning procedure.

The paper is presented in Russian.

Key words: fire blight, enterobacteria, bacteriophages, electron microscopy, restriction analysis of genomes.

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. *Tovkach F.I.* Структурная организация частиц и рестрикционный анализ ДНК умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2002. – **71**, №1. – С. 75–81.
2. *Tovkach F.I.* Изучение фагоустойчивости с помощью умеренного бактериофага ZF40 // Там же. – 2002. – **71**, №1. – С. 82–88.
3. *Tovkach F.I., 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.
4. *Tovkach F.I.* Молекулярно-биологические свойства вирулентного бактериофага FE44 // Доповіді НАН України. – 2002. – № 6. – С. 175–178.
5. *Tovkach F.I., Мороз С.Н., Король Н.А., Файдюк Ю.В., Кушкіна А.И.* Поливалентность бактериофагов, изолированных из плодовых деревьев, пораженных бактериальным ожогом // Микробиол. журн. – 2013. – **75**, №2. – С. 80–88.
6. *Adriaenssens E.M., Ceysens P.-J., Dunon V., Ackermann H.-W., Van Vaerenbergh J., Maes M., De Proft M., Lavigne R.* Bacteriophages LIMelight and LIMEzero of *Pantoea agglomerans*, belonging to the “phiKMV-Like viruses” // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – **77**, N 10. – P. 3443–3450.
7. *Born Y., Fieseler L., Marazzi J., Lurz R., 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 // Ibid. – 2011. – **77**, N 17. – P. 5945–5954.
8. *Comeau A.M., Tremblay D., Moineau S., Rattei T., Kushkina A.I., Tovkach F.I., Krisch H.M., Ackermann H.-W.* Phage morphology recapitulates phylogeny: The comparative genomics of a new group of myoviruses // PLoS ONE – 2012. – **7**, N 7. – e40102.
9. *Gill J.J., Svircev A.M., Smith R., Castle A.J.* Bacteriophages of *Erwinia amylovora* // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – **69**, 4. – P. 2133–2138.
10. *Hatfull G.F.* Bacteriophage genomics // Cur. Opinion Microbiol. – 2008. – **11**. – P. 447–453.
11. *Reyes A., Semenkovich N.P., Whiteson K., Rohwer F., Gordon J.I.* Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut // Nat. Rev. Microbiol. – 2012. – **10**. – P. 607–617.
12. *Roach D.R., Sjaarda D.R., Castle A.J., Svircev A.M.* Host exopolysaccharide quantity and composition impact *Erwinia amylovora* bacteriophage pathogenesis // Appl. Environ. Microbiol. – 2013. – **79**, N 10. – P. 3249–3256.
13. *Schnabel E.L., Jones A.L.* Isolation and characterization of five *Erwinia amylovora* bacteriophages and assessment of phage resistance in strains of *Erwinia amylovora* // Ibid. – 2001. – **67**, N 1. – P. 59–64.
14. *Toth I.K., Mulholland V., Cooper V., Bentley S., Shih Y.-L., Perombelon M.C.M., Salmond G.P.C.* Generalized transduction in the potato blacked pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* by bacteriophage ϕ M1 // Mol. Microbiol. – 1997. – **143**, N 10. – P. 2433–2438.

Отримано 11.04.2013