

А. А. Бойко<sup>1</sup>, А. И. Жуминская<sup>2</sup>, А. И. Кушкина<sup>1</sup>,  
В. А. Иваныця<sup>2</sup>, Ф. И. Товкач<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина,

<sup>2</sup> Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,  
Одесса, 65082, Украина, e-mail: boets2008@ukr.net

## ХАРАКТЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КЕУ-ПОДОБНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ *ERWINIA AMYLOVORA*

**Цель.** Изучить гетерогенность фагового изолята, полученного из груш, пораженных *Erwinia amylovora*. **Методы.** Гетерогенность фаговых изолятов изучали с использованием ионообменной хроматографии низкого давления (LPLC), электронно-микроскопического анализа вирионов и рестрикционного анализа ДНК. В работе использовали бактериофаги КЕУ, КЕУ/7 и КЕУ/25. **Результаты.** Показано, что изолят содержит двухкомпонентную популяцию КЕУ-подобных фагов, частицы которых различаются по сродству к DEAE-целлюлозе. Фаги обеих субпопуляций представлены вирионами В1-морфотипа (семейство Siphoviridae) с правильными икосаэдрическими капсидами диаметром около 77 нм и длиной хвостовых отростков, близкой к 172 нм. Эти фаговые частицы по морфологии и размеру близки к таковым прототипного фага КЕУ. По данным рестрикционного анализа геномы фагов чистых линий КЕУ/7 и КЕУ/25 близки между собой и имеют размеры около 72 кб, что на 25–27% меньше, чем размер генома фага КЕУ. Предполагается, что фаги КЕУ/7 и КЕУ/25 представляют собой делеционные варианты фага КЕУ. **Вывод.** Гетерогенность фаговых изолятов, полученных из пораженных растений, имеет две ключевые характеристики: изменение сродства частиц к DEAE-целлюлозе и генетической структуры их генома. Дальнейшие исследования как фаговых изолятов так и фаговых популяций важны для изучения экологии и возможности использования бактериофагов для биоконтроля опасных патогенов древесных растений.

**Ключевые слова:** гетерогенность фаговой популяции, КЕУ-подобные бактериофаги, *Erwinia amylovora*.

Традиционная схема изолирования бактериофагов из различных источников основана на обогащении активных частиц и получении чистой вирусной линии [1]. Однако такая лабораторная практика не предлагает исследований, направленных на комплексное изучение популяций бактериальных вирусов.

Показано, что для понимания экологии фагов на уровне их популяционного разнообразия важно использовать широкий набор индикаторных культур, и только таким образом могут быть получены чистые вирусные линии [2].



Целью работы было изучить гетерогенность фагового изолята, полученного из груш, пораженных *Erwinia amylovora*.

### Материалы и методы

Препаративное количество фаговых частиц было получено методом слитного лизиса без предварительного клонирования на двух штаммах *Pantoea agglomerans* g157 и 9/7-2. Для изучения круга хозяев и эффективности посева фагов, кроме вышеуказанных, были использованы штаммы *P. agglomerans* 157/RI и g150, *E. amylovora* K8 и *E. horticola* 60-2n, 450, 450(59) и 450 (P1).

В работе были изучены фаги из грушевого изолята и бактериофаг KEУ из айвового изолята.

Разделение фаговых частиц осуществляли методом жидкостной хроматографии низкого давления (ЖХНД) на волокнистой DEAE-целлюлозе 23SS (“Serva”) на хроматографе Biologic LP BIORAD в системе натрий-фосфатного буфера (0,01M NaP, pH 7). Предварительный анализ фаговых лизатов проводили на аналитической колонке BIORAD Macro-Prep DEAE Cartridge Bio-S; объем образцов составлял 1 мл. Для дальнейшего анализа вирусных препаратов использовали стандартную препаративную колонку общим объемом 65 мл. Объем носителя составлял 25–30 мл, объем анализируемого образца – 150–200 мл. Время нанесения образца достигало 2 ч, общее время элюции – 75 мин.

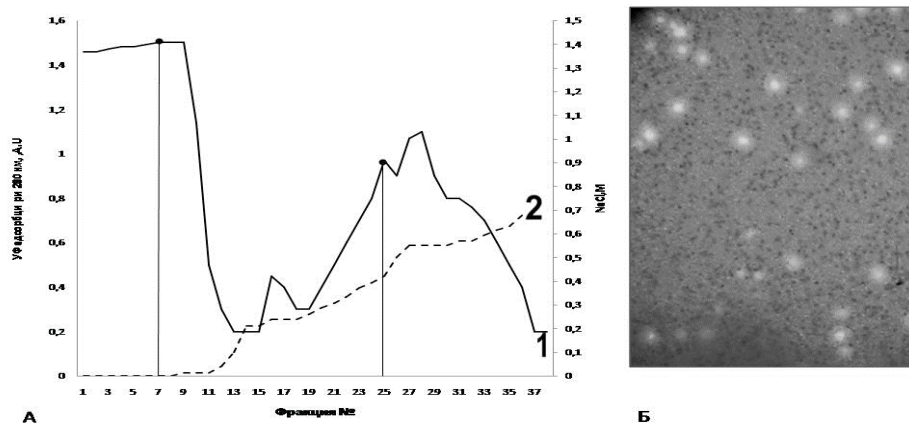
После нанесения фаголизата на колонку, фаговые частицы элюировали раствором NaCl с линейно возрастающей концентрацией от 0,1 до 0,7 M в NaP-буфере. Содержимое фракций проверяли на наличие вирионов по поглощению при 280 нм, биологическому титру и с помощью электронной микроскопии. Пиковые фракции объединяли и центрифугировали с использованием ротора Beckman SW28, 24 тыс. об/мин, 3 ч, 10 °C. Осадки растворяли в 400 мкл ТМ буфера (10 mM трис-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>). После этого фаговые частицы очищали в ступенчатом градиенте CsCl (1,4–1,6 г/см<sup>3</sup>) и диализовали против ТМ-буфера. За эффективность посева (ЭП) принимали отношение титра фага на тестируемой культуре к титру на культуре на которой данный фаг проявлял максимальную активность.

Вирионную ДНК для рестрикционного анализа выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Указанные методы детально описаны в работе [4]. Электронно-микроскопические образцы были получены с помощью трансмиссивного электронного микроскопа JEOL JEM 1400, образцы адсорбировали 20–50 мин на сетке-подложке, покрытой нитроцеллюлозой, отмывали в деионизированной воде 10–15 мин и окрашивали 2% уранилацетатом в течение 40–90 с.

### Результаты исследований и их обсуждение

На рис. 1, а представлена хроматограмма суммарного фагового препарата, полученного на индикаторном штамме *P. agglomerans* g157. Несмотря на то, что эта хроматограмма свидетельствует о гетерогенности исследуемого образца, негативные фаговые колонии были морфологически однотипными (см. рис. 1, б).





**Рис. 1. ЖХНД-профиль суммарного фагового препарата, полученного на *P. agglomerans* g157 (А) и морфология негативных фаговых колоний (Б).**  
Примечание: 1 – кривая поглощения, 2 – градиент концентрации NaCl; пиковые фракции обозначены вертикальными линиями.

**Fig. 1. LPLC- profile of the total phage preparation obtained on *P. agglomerans* g157 (А) and morphology of negative phage colonies (Б).**  
Note: 1 – absorption curve, 2 – gradient of NaCl concentration; peak fractions are indicated by the vertical lines.

При разделении частиц на DEAE-колонке обнаружены две основные области элюции. Первая область отражает выход фаговых частиц без добавления NaCl (фракции № 1–17). Вторая область (фракции № 18–35) формируется при элюции образца в линейном градиенте NaCl 0,5–0,7 М с максимумом концентрации при 280 нм в зоне 0,5 М NaCl. После определения титра каждой из фракций было обнаружено, что максимальная биологическая активность соответствовала фракции № 7 из первой области и фракции № 25 из второй (рис. 1, а). Полученные данные свидетельствуют о хроматографической гетерогенности частиц фагового препарата.

Из фракций № 7 и 25 на штамме *P. agglomerans* g157 были отобраны одиночные фаговые бляшки, 7-кратно клонированы и получены в препаративных количествах для того, чтобы установить, изменяется ли характеристика изолята в последующих пассажах. Затем каждый из этих препаратов был повторно проанализирован с помощью ЖХНД. Для двух исследуемых фаговых препаратов получены идентичные хроматограммы чистых линий фагов, названных КЕУ/7 и КЕУ/25, соответственно.

На рис. 2 представлены результаты повторного ЖХНД-исследования для фага КЕУ/25.

Таким образом, гетерогенность фаговой популяции из айвового изолята характеризуется содержанием частиц двух типов, которые имеют разное сродство к DEAE-целлюлозе. Частицы I типа смываются чистым NaP-буфером, а частицы II типа элюируются буфером, содержащим NaCl.

После хроматографии фаги чистых линий КЕУ/7 и КЕУ/25 были очищены в градиенте CsCl. Плавающая плотность образцов была приблизительно

одинаковой и составляла 1,53 и 1,52 г/см<sup>3</sup> для фагов KEY/7 и KEY/25, соответственно. CsCl-препараты фагов характеризовались наличием одной гомогенной полосы в градиенте.

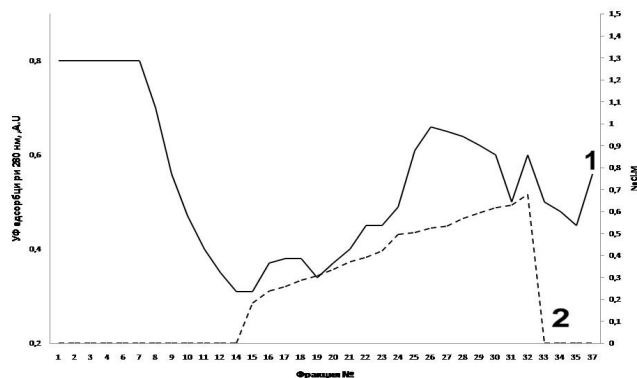


Рис. 2. ЖХНД-профиль фага KEY/25.  
Пояснения см. рис. 1.

Fig. 2. LPLC-profile of KEY/25 phage.  
Explanations see Fig. 1

Электронно-микроскопические исследования чистых линий фагов показали наличие частиц В1-морфотипа (сем. *Siphoviridae*), которые имеют икосаэдрический капсид размером 72,1 и 76,7 нм, и несокращающийся хвостовой отросток размером 176,5 и 171,1 нм для фагов KEY/7 и KEY/25, соответственно, (рис. 3).

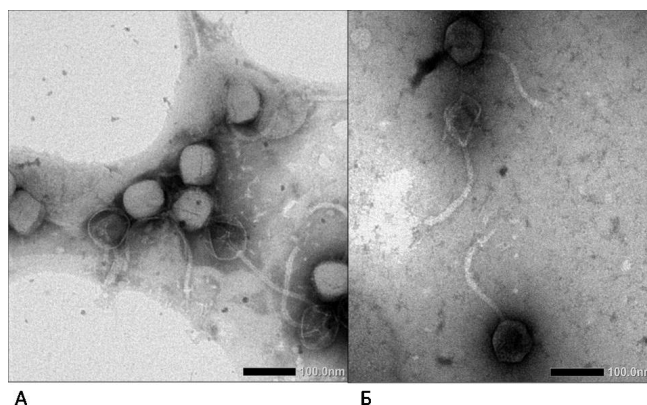


Рис. 3. Электронные микрофотографии фагов KEY/7 (А) и KEY/25 (Б) контрастированные 2%-й фосфовольфрамовой кислотой.  
Масштабные линии соответствуют 100 нм.

Fig. 3. Electron microphotographs of the KEY/7 (A) and KEY/25 (B) phages contrasted with 2% phosphotungstic acid.  
Scale bar corresponds to 100 nm.

Эти параметры указывают на то, что фаговый изолят содержит бактериофаги, которые как по размерам, так и по морфологии идентичны описанному ранее фагу KEY [6]. Поэтому в последующих экспериментах бактериофаг KEY был использован как стандарт для сравнения.

В табл. 1 приведены показатели эффективности посева (ЭП) и круг хозяев трех фагов среди штаммов *P. agglomerans*, *E. amylovora* и *E. horticola*.

Таблица 1

Эффективность посева фагов KEY, KEY/7 и KEY/25 на штаммах *P. agglomerans*, *E. amylovora* и *E. Horticola*

Table 1

Efficiency of KEY, KEY/7 and KEY/25 phages planting on *P. agglomerans*, *E. amylovora* and *E. horticola* strains

Штамм		Бактериофаг		
		KEY	KEY/7	KEY/25
<i>P. agglomerans</i>	g157/RI	1,0	1,0	1,0
	g157	0,2	0,48	0,62
	9/7-2	0,6	0,19	0,15
	g150	0,13	0,05	0,31
<i>E. amylovora</i>	K8	0,47	0,15	0,05
<i>E. horticola</i>	450	0,1	1,0	1,0
	450(59)	1,0	-	0,11
	450(P1)	-	-	0,66
	60- 2n	-	0,006	-

Примечание . «-» – эффективность посева не определена.

Note: «-» – plating efficiency is not defined.

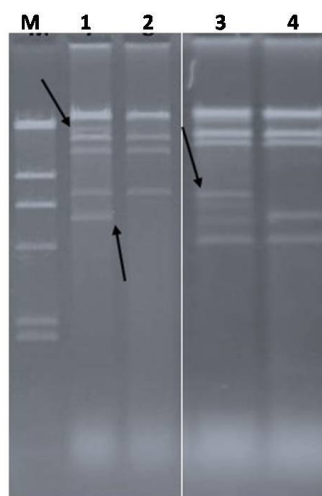
Как видно из табл. 1, почти все KEY-фаги способны репродуцироваться в клетках штаммов патогенных бактерий *E. amylovora* и *E. horticola*. Наибольшие показатели ЭП получены для штаммов которые *P. agglomerans*, фитопатогенами не являются, но ассоциированы с животными (g157) или растениями (9/7-2 и g150) (Ю.К. Фомичев, личное сообщение). Этот факт наряду с данными литературы [5] позволяет утверждать, что *P. agglomerans* является универсальным индикатором для обнаружения и идентификации бактериофагов, персистирующих в растительном материале. Максимально возможные значения ЭП для фагов KEY/7 и KEY/25 получены в случае *P. agglomerans* g157/RI — штамма, устойчивого к фагу из изолята выделенного из айвы (обозначенного I) [2], а также на штамме *E. horticola* 450.

Наличие профагов P1 и 59 в клетках штамма *E. horticola* 450 незначительно ограничивает развитие фага KEY/25, что, скорее всего, связано с abortивными инфекциями в этих лизогенных клетках [7]. Оба KEY-подобных фага имеют близкие значения ЭП на газонах *P. agglomerans* g157, 9/7-2 и *E. horticola* 450, однако отличаются от контрольного фага KEY. Обнаружи-



вается также разница в ЭП между KEY/7 и KEY/25 при их сравнительном исследовании на клетках *P. agglomerans* g150, *E. amylovora* K8 и *E. horticola* 60–2п, что наряду с LPLC-анализом подтверждает популяционную гетерогенность исследуемого фагового изолята.

С помощью эндонуклеаз *Bgl*I и *Kpn*I был проведен сравнительный рестрикционный анализ ДНК фагов KEY, KEY/7 (не представлено) и KEY/25. Как видно из рис. 4, общие узоры рестрикции вирионных ДНК фагов KEY и KEY/25 совпадают. Однако для обеих рестриктаз установлено, что фаговые геномы существенно отличаются по размеру (табл. 2). Так, в случае *Bgl*I геном фага KEY составляет 99,2 кб, тогда как геном KEY/25 уменьшен до 72 кб.



**Рис. 4. Рестрикционный анализ ДНК фагов KEY и KEY/25.**  
1, 2 – *Bgl*I-гидролиз вирионной ДНК фагов KEY и KEY/25, 3, 4 – *Kpn*I-гидролиз вирионной ДНК фагов KEY и KEY/25 соответственно. М – *Hind*III фрагменты ДНК бактериофага λ. Стрелками указаны дополнительные фрагменты.

**Fig.4. Restriction analysis of KEY and KEY/25 phages DNA.**  
1, 2 – *Bgl*I- hydrolysis of virion DNA of KEY and KEY/25 phages, 3, 4 – *Kpn*I- hydrolysis of virion DNA of KEY and KEY/25 phages respectively. М – *Hind*III- DNA fragments of λ bacteriophage. The arrows indicate the additional fragments.

Таблица 2

**Размеры ДНК фагов KEY и KEY/25**

Table 2

**KEY and KEY/25 phages DNA size**

Показатель	<i>Bgl</i> I			<i>Kpn</i> I		
	KEY*	KEY	KEY/25	KEY*	KEY	KEY/25
Количество фрагментов	5	6	4	8	8	5
Размер (kb)	108,1	99,2	72,0	108,1	98,0	71,4

Примечание: \* – количество фрагментов на кольцевой карте фага KEY, полученной из данных полного сиквенса вирионной ДНК *in silico*.

Note: \* – number of fragments on the ring map of KEY phage obtained from the data of the full sequence of virion DNA *in silico*.





При гидролизе ДНК КЕУ эндонуклеазой *Bgl*I образуется два дополнительных фрагмента размером 22,7 и 6,0 кб, тогда как гидролиз его ДНК *Kpn*I приводит к появлению трех дополнительных фрагментов – 12,6; 6,9 и 6,7 кб относительно КЕУ-подобных фагов.

Из приведенных данных следует, что размер дополнительного участка в геноме КЕУ может достигать 25–27%.

Таким образом, разница в размерах геномов фагов КЕУ/25 (грушевый изолят) и КЕУ (айвовый изолят) связана с существенной генетической мутацией делеционно-вставочного типа. При этом мутация, скорее всего, существенно не отражается на размерах фаговых капсидов. Рестрикционный анализ показал также отсутствие существенных различий между ДНК фагов КЕУ/25 и КЕУ/7, что подтверждает их тесное генетическое родство. Фаги КЕУ/25 и КЕУ/7, отличающиеся от фага КЕУ по узору рестрикции, скорее всего, представляют собой его делеционные варианты.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что КЕУ-подобные бактериофаги одного экологического региона персистируют как в пораженных ожоговой болезнью айве, так и в груше. Гетерогенность фаговых изолятов, полученных из пораженных растений, имеет две ключевые характеристики: изменение сродства частиц к DEAE-целлюлозе и генетической структуры их генома. Дальнейшие исследования как фаговых изолятов так и фаговых популяций важны для изучения экологии и возможности использования бактериофагов для биоконтроля опасных древесных патогенов.

А. А. Бойко<sup>1</sup>, Г. І. Жумінська<sup>2</sup>, А. І. Кушкіна<sup>1</sup>,  
В. О. Іваниця<sup>2</sup>, Ф. І. Товкач<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ,  
<sup>2</sup>Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, e-mail: boets2008@ukr.net

## ХАРАКТЕРИСТИЧНІ ОСОБЛИОСТІ КЕУ-ПОДІБНИХ БАКТЕРІОФАГІВ *ERWINIA AMYLOVORA*

### Реферат

**Мета.** Вивчити гетерогенність фагового ізоляту, що був одержаний з гілок та листя груші, уражених *Erwinia amylovora*. **Методи.** Гетерогенність фагових ізолятів вивчали з використанням системи, котра включала себе йонообмінну хроматографію низького тиску (LPLC), електронно-мікроскопічний аналіз віріонів і рестрикційний аналіз ДНК. В роботі були використані бактериофаги КЕУ, КЕУ/7 і КЕУ/25. **Результати.** Ізолят містить двокомпонентну популяцію КЕУ-подібних фагів, частки яких розрізняються за спорідненістю до DEAE-целюлози. Фаги обох субпопуляцій представлені віріонами *V1* морфотипу (родина *Siphoviridae*) із правильними ікосаедричними капсидами діаметром близько 77 нм та довжиною хвостових відростків, близькою до 172 нм. Ці фагові частки за морфологією та розміром подібні до таких прототипного фага КЕУ. За даними рестрикційного аналізу геному фагів чистих ліній КЕУ/7 та КЕУ/25 подібні та мають розмір близько 72 кб, що на 25–27% менше, ніж розмір геному фага КЕУ. Припускається, що фаги КЕУ/7 та КЕУ/25 являють собою делеційні варіанти фага КЕУ.



**Висновок.** Гетерогенність фагових ізолятів, отриманих з уражених рослин, має дві ключові характеристики: змінення спорідненості часток до DEAE-целюлози і генетичної структури їх геному. Подальші дослідження як фагових ізолятів так і фагових популяцій важливі для вивчення екології та можливості використання бактеріофагів для біоконтролю небезпечних патогенів деревних рослин.

**Ключові слова:** гетерогенність фагової популяції, KEY-подібні бактеріофаги, *Erwinia amylovora*.

**A. A. Boyko<sup>1</sup>, G. I. Zhuminska<sup>2</sup>, A. I. Kushkina<sup>1</sup>,  
V. O. Ivanytsia<sup>2</sup>, F. I. Tovkach<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, 154, Acad. Zabolotny str., 03680, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>Odesa I. I. Mechnykov National University, 2, Shampansky lane, 65058, Odesa, Ukraine, e-mail: boets2008@ukr.net

## CHARACTERISTIC FEATURES OF KEY-LIKE BACTERIOPHAGES OF *ERWINIA AMYLOVORA*

### Summary

**Aim.** To study the heterogeneity of phage isolates obtained from twigs and leaves of pear affected with *Erwinia amylovora*. **Methods.** The heterogeneity of phage isolates was studied using the system included low pressure liquid chromatography (LPLC), electron-microscopy analysis of virions and DNA restriction analysis. In this work, the bacteriophages KEY, KEY/7 and KEY/25 were used. **Results.** the isolate contains a two-component population of KEY-like phage particles, which differ in affinity for DEAE-cellulose. Phages of both subpopulations are represented by virions of B1 morphotype (Siphoviridae family) with regular icosahedral capsids with the diameter of about 77 nm and the length of the caudal appendages close to 172 nm. These phage particles are similar to those of the prototype KEY phage in morphology and size. According to the restriction analysis data, the genomes of the pure line phages KEY/7 and KEY/25 are similar to each other and have the size of about 72 kb, which is 25–27% less than the size of the genome of KEY phage. It is assumed that the phages KEY/7 and KEY/25 represent deletion variants of KEY phage. **Conclusions.** The heterogeneity of phage isolates get from damaged plants have two main characteristics: the changes of affinity of particles to DEAE-cellulose and the changes of genetic structure of its genome. Further research both phage isolates and phage population are important for study of ecology and opportunity of phage using for biocontrol of dangerous woody plants pathogens.

**Key words:** phage population heterogeneity, KEY-like bacteriophages, *Erwinia amylovora*.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carlson K. Appendix: Working with Bacteriophages: Common Techniques and Methodological Approaches. Bacteriophages: biology and applications. In Kutter E., Sulakvelidze A. (eds.). Boca Raton: CRC Press., 2005. – 428–485p.





2. Товкач Ф. И., Мороз С. Н., Король Н. А., Файдюк Ю. В., Кушкіна А. И. Поливалентность бактериофагов, изолированных из плодовых деревьев, пораженных бактериальным ожогом // Мікробіол. журн. –2013. –75, № 2. – С. 80–88.

3. Товкач Ф. И., Файдюк Ю. В., Король Н. А., Кушкіна А. И., Мороз С.Н., Мучник Ф. В. Электронная микроскопия и рестрикционный анализ бактериофагов, изолированных из айвы и груши с симптомами бактериального ожога // Мікробіол. журн. – 2013. – 75, № 5. – С. 67–75.

4. Товкач Ф. И., Григорян Ю. А., Рубан В. И., Данилейченко В. В., Кишко Я. Г. Рестрикционная карта пермутированной ДНК умеренного бактериофага 59 *Erwinia carotovora* // Мол. генетика, микробиология и вирусология. – 1988. – № 1. – С. 20–24.

5. Adrianssens E.M., Ceeysens 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 “phiKMVLike Viruses” // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. –77, № 10. – P. 3443–3450.

6. Faiduk Y. V., Boyko A. A., Muchnyk F. V., Tovkach F. I. Virion morphology and structural organization of polyvalent bacteriophages TT10-27 and KEY // Мікробіол. журн. – 2015. – 77, № 3. – С. 36–46.

7. Faidiuk I. V., Tovkach F. I. Exclusion of polyvalent T7-like phages by prophage elements // Мікробіол. журн. – 2014. – 76, № 5. – P. 42–50.

## References

1. Carlson K. Appendix: Working with Bacteriophages: Common Techniques and Methodological Approaches. In Kutter E., Sulakvelidze A. (Eds.). Bacteriophages: biology and applications. Boca Raton: CRC Press, 2005; 428–485p.

2. Tovkach FI, Moroz SN, Korol NA, Faiduk YV, Kushkina AI. Polyvalence of bacteriophages isolated from fruit trees, affected by bacterial fire blight. Mikrobiol Zh. 2013; 75 (2): 80-88. (in Russian)

3. Tovkach FI, Faiduk YV, Korol NA, Kushkina AI, Moroz SN, Muchnyk FV Electron microscopy and restriction analysis of bacteriophages isolated from quince and pear with symptoms of fire blight. Mikrobiol Zh. 2013; 75 (5): 67-75 (in Russian).

4. Tovkach FI, Grizorian IuA, Ruban VI, Danileichenko VV, Kishko IaG. Restriction map of permuted DNA of *Erwinia carotovora* temperate bacteriophage 59. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 1988; (1): 20-24 (in Russian).

5. Adrianssens EM, Ceeysens P-J, Dunon V, Ackermann HW, 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 (10): 3443-3450.

6. Faiduk YV, Boyko AA, Muchnyk FV, Tovkach FI Virion morphology and structural organization of polyvalent bacteriophages TT10-27 and KEY. Mirrobiol Zh. 2015; 77(3): 36-46.

7. Faidiuk IV, Tovkach FI Exclusion of polyvalent T7-like phages by prophage elements. Mikrobiol Zh. 2014; 76 (5): 42-50.

Стаття надійшла до редакції 12.12.2017 р.

