

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.12.097>

УДК 578.4:578.81:579.842.1/.2

**А.А. Бойко¹, А.И. Жуминская²,
А.И. Кушкина¹, В.А. Иваница², Ф.И. Товкач¹**

¹ Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

² Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова

E-mail: boets2008@ukr.net

Характеристика КЕУ-подобных бактериофагов *Erwinia amylovora*

Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Ф.И. Товкачем

*Изучена гетерогенность фагового изолята, полученного из веток и листьев груши, пораженных *Erwinia amylovora*. Установлено, 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.*

Ключевые слова: *гетерогенность фаговой популяции, жидкостная хроматография низкого давления, электронная микроскопия, рестрикционный анализ, 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.

Недавно было показано, что для понимания экологии фагов на уровне их популяционного разнообразия важно использовать широкий набор индикаторных культур, и только после этого могут быть получены чистые вирусные линии [2].

Цель представленного исследования состояла в изучении гетерогенности фагового изолята 6*, полученного из веток и листьев груши, пораженных *Erwinia amylovora* [3].

Препаративное количество фаговых частиц было получено методом слитного лизиса без предварительного клонирования на двух штаммах *Pantoea agglomerans* (Pag) g157 и 9/7-2. Для изучения круга хозяев и эффективности посева фагов, кроме вышеуказанных,

© А.А. Бойко, А.И. Жуминская, А.И. Кушкина, В.А. Иваница, Ф.И. Товкач, 2017

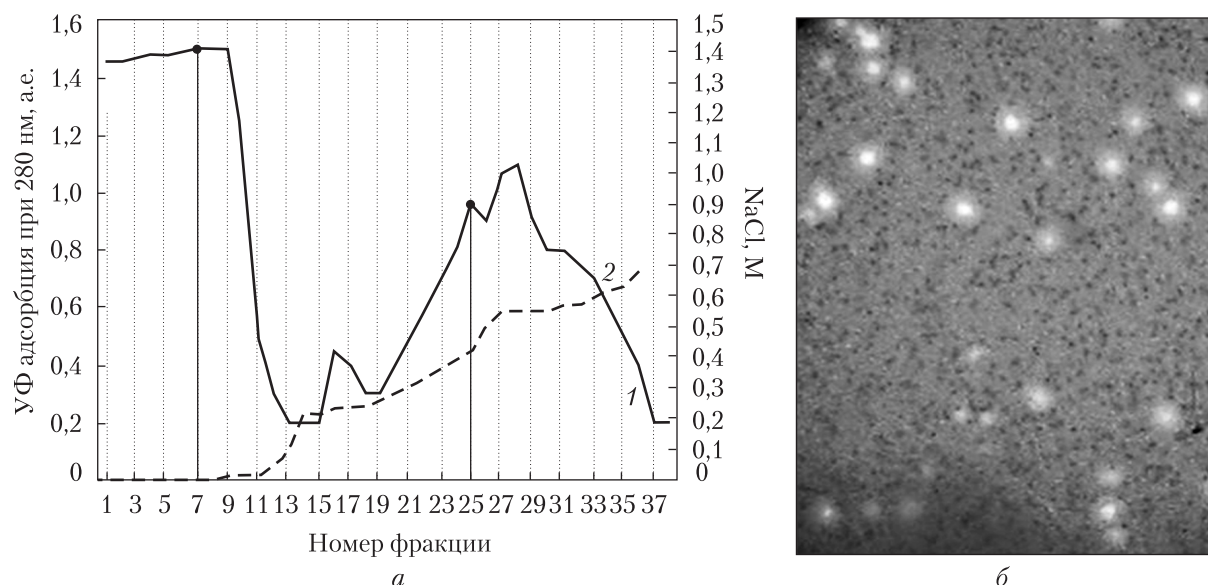


Рис. 1. ЖХНД-профиль суммарного фагового препарата, полученного на *Pag g157* (а) и морфология негативных фаговых колоний на газоне того же штамма (б). Здесь и на рис. 2: 1 – кривая поглощения, 2 – градиент концентрации NaCl; пиковые фракции обозначены вертикальными линиями

были использованы штаммы *Pag g157/RI* и *g150*, *E. amylovora* K8 и *E. horticola* 60-2п, 450, 450(59) и 450 (P1).

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 (0,01 M 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 колонку 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 в роторе 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 MgCl₂). После этого фаговые частицы очищали в ступенчатом градиенте CsCl (1,4–1,6 г/см³) и диализовали против ТМ-буфера. Вирионную ДНК для рестрикционного анализа выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Указанные методы детально описаны в работе [4].

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

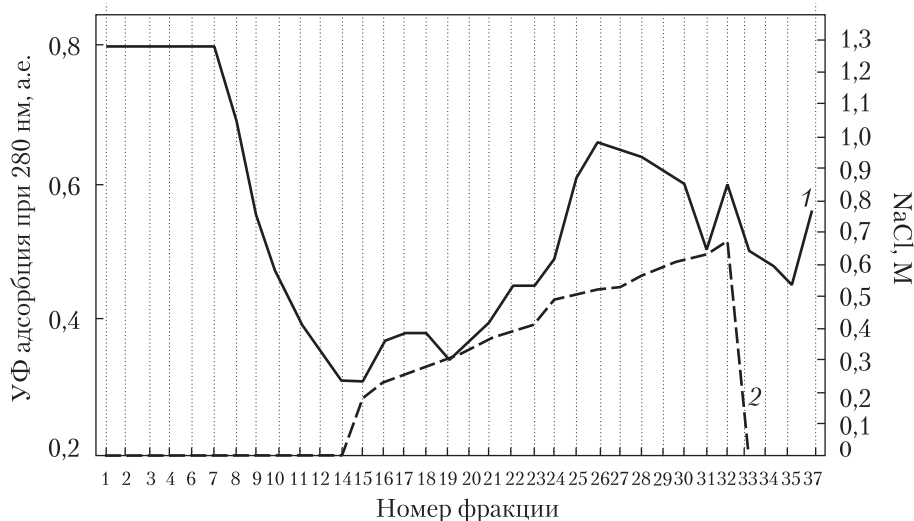


Рис. 2. ЖХНД-профиль фага KEY/25

При разделении частиц на DEAE-колонке обнаружены две основные области элюции. Первая область отражает выход фаговых частиц без добавления NaCl (фракции № 1–16). Вторая область (фракции № 17–35) 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 (см. рис. 1, а). Полученные данные свидетельствуют о хроматографической гетерогенности частиц фагового препарата.

Из фракций № 7 и 25 на штамме *Pag 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 KEY/7 и KEY/25 соответственно.

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

Таким образом, гетерогенность фаговой популяции из изолята 6* 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 KEY/7 и KEY/25 были очищены в градиенте CsCl. Плавающая плотность образцов была приблизительно одинаковой и составляла 1,53 и 1,52 г/см³ для фагов KEY/7 и KEY/25 соответственно. CsCl-препараты фагов характеризовались наличием одной гомогенной полосы в градиенте.

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).

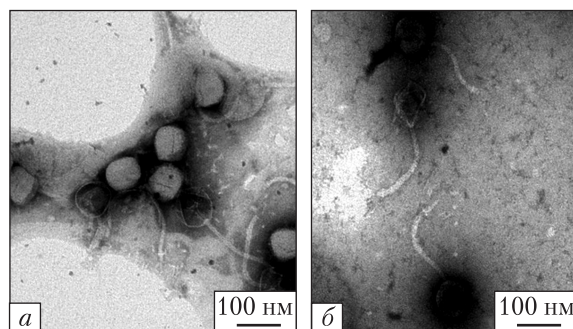


Рис. 3. Электронные микрофотографии фагов KEY/7 (а) и KEY/25 (б) контрастированные 2 %-й фосфовольфрамовой кислотой

Таблица 1. Эффективность посева фагов KEY, KEY/7 и KEY/25 на штаммах *P. agglomerans*, *E. amylovora* и *E. horticola*

Культура	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	$4,2 \cdot 10^{-4}$

Примечание. «—» — эффективность посева не определена.

Таблица 2. Размеры вирионных ДНК фагов KEY и KEY/25

Показатель	BgI			KpnI		
	KEY*	KEY	KEY/25	KEY*	KEY	KEY/25
Количество фрагментов	5	6	4	8	8	5
Размер, кб	108,1	99,2	72,0	108,1	98,0	71,4

* Количество фрагментов на кольцевой карте фага KEY, полученной из данных полного сиквенса вирионной ДНК *in silico*.

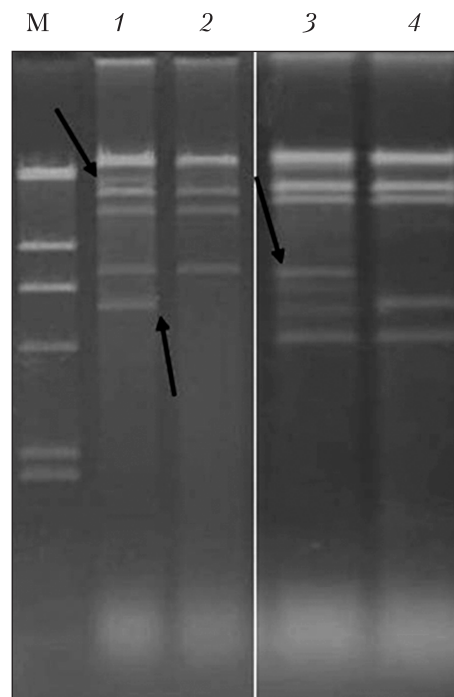
Эти параметры указывают на то, что фаговый изолят содержит бактериофаги, которые как по размерам, так и по морфологии идентичны описаному ранее фагу KEY [5]. Поэтому в последующих экспериментах бактериофаг KEY был использован как стандарт для сравнения.

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

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 *Pag*, которые 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 [6] 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 *Pag* g157/RI — штамма, устойчивого к фагу из изолята 1* [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,

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



связано с абортными инфекциями в этих лизогенных клетках [7]. Оба KEY-подобных фага имеют близкие значения ЭП на газонах *Pag* g157, 9/7-2 и *E. hortícola* 450, однако отличаются от контрольного фага KEY. Обнаруживается также разница в ЭП между KEY/7 и KEY/25 при их сравнительном исследовании на клетках *Pag* g150, *E. amylovora* K8 и *E. hortícola* 60–2n, 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.

При гидролизе ДНК KEY 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 KEY-подобных фагов.

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

Таким образом, разница в размерах геномов фагов KEY/25 (грушевый изолят) и KEY (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 KEY/25 и KEY/7, что подтверждает их тесное генетическое родство. Фаги KEY/25 и KEY/7, отличающиеся от фага KEY по узору рестрикции, скорее всего, представляют собой его делеционные варианты.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что KEY-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.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Carlson K. Appendix: Working with Bacteriophages: Common Techniques and Methodological Approaches. *Bacteriophages: biology and applications*. Kutter E., Sulakvelidze A. (eds.). Boca Raton: CRC Press., 2005. P. 428–485.
2. Товкач Ф.И., Мороз С.Н., Король Н.А., Файдюк Ю.В., Кушкина 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., Кушкина 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. 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.
6. 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 “phiKMV-Like Viruses”. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. **77**, № 10. P. 3443–3450.
7. Faidiuk I.V., Tovkach F.I. Exclusion of polyvalent T7-like phages by prophage elements. *Мікробіол. журн.* 2014. **76**, № 5. С. 42–50.

Поступило в редакцию 20.07.2017

REFERENCES

1. Carlson, K. (2005). Appendix: Working with Bacteriophages: Common Techniques and Methodological Approaches. In Kutter E., Sulakvelidze A. (Eds.). *Bacteriophages: biology and applications* (pp. 428-485). Boca Raton: CRC Press.
2. Tovkach, F. I., Moroz, S. N., Korol, N. A., Faiduk, Y. V. & Kushkina, A. I. (2013). Polyvalence of bacteriophages isolated from fruit trees, affected by bacterial fire blight. *Mikrobiol Zh.*, 75, No. 2, pp. 80-88 (in Russian).
3. Tovkach, F. I., Faiduk, Y. V., Korol, N. A., Kushkina, A. I., Moroz, S. N. & Muchnyk, F. V. (2013). Electron microscopy and restriction analysis of bacteriophages isolated from quince and pear with symptoms of fire blight. *Mikrobiol Zh.*, 75, No. 5, pp. 67-75 (in Russian).
4. Tovkach, F. I., Grizorian, Iu. A., Ruban, V. I., Danileichenko, V. V. & Kishko, Ia. G. (1988). Restriction map of permuted DNA of *Erwinia carotovora* temperate bacteriophage 59. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.*, No. 1, pp. 20-24 (in Russian).
5. Faiduk, Y. V., Boyko, A. A., Muchnyk, F. V. & Tovkach, F. I. (2015). Virion morphology and structural organization of polyvalent bacteriophages TT10-27 and KEY. *Mikrobiol Zh.*, 77, No. 3, pp. 36-46.
6. Adrianssens, E. M., Ceeysens, P.-J., Dunon, V., Ackermann, H.-W., Van Vaerenbergh, J., Maes, M., De Proft, M. & Lavigne, R. (2011). Bacteriophages LIMelight and LIMEzero of *Pantoea agglomerans*, Belonging to the “phiKMV-Like Viruses”. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, No. 10, pp. 3443-3450.
7. Faidiuk, I. V., Tovkach, F. I. (2014). Exclusion of polyvalent T7-like phages by prophage elements. *Mikrobiol. Zh.*, 76, No. 5, pp. 42-50.

Received 20.07.2017

А.А. Бойко¹, Г.І. Жумінська², А.І. Кушкіна¹, В.О. Іванюця², Ф.І. Товкач¹

¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

² Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова

E-mail: boets2008@ukr.net

ХАРАКТЕРИСТИКА KEY-ПОДІБНИХ БАКТЕРІОФАГІВ *ERWINIA AMYLOVORA*

Досліджено гетерогенність фагового ізоляту, що був одержаний з гілок та листя груші, уражених *Erwinia amylovora*. Встановлено, що ізолят містить двокомпонентну популяцію KEY-подібних фагів, частки яких розрізняються за спорідненістю до DEAE-целюлози. Фаги обох субпопуляцій представлені віріонами В1-

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 KEY. За даними рестрикційного аналізу геноми фагів чистих ліній KEY/7 та KEY/25 подібні та мають розмір близько 72 кб, що на 25–27 % менше, ніж розмір геному фага KEY. Припускається, що фаги KEY/7 та KEY/25 являють собою делеційні варіанти фага KEY.

Ключові слова: гетерогенність фагової популяції, рідинна хроматографія низького тиску, електронна мікроскопія, рестрикційний аналіз, KEY-подібні бактериофаги, *Erwinia amylovora*.

A.A. Boyko¹, G.I. Zhuminska²,
A.I. Kushkina¹, V.O. Ivanytsya², F.I. Tovkach¹

¹ Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine, Kiev

² Mechnikov Odesa National University

E-mail: boets2008@ukr.net

CHARACTERISTIC OF KEY-LIKE BACTERIOPHAGES OF *ERWINIA AMYLOVORA*

The study of the heterogeneity of phage isolates obtained from twigs and leaves of pear affected with *Erwinia amylovora* is conducted. It is established that 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 a diameter of about 77 nm and a 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 a 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.

Keywords: phage population heterogeneity, low-pressure liquid chromatography, electron microscopy, restriction analysis, KEY-like bacteriophages, *Erwinia amylovora*.