

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

**ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГА *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*
SUBSP. *CAROTOVORUM* PP16, ПЕРСПЕКТИВНОГО ДЛЯ БИОКОНТРОЛЯ
МЯГКОЙ ГНИЛИ КАРТОФЕЛЯ**

© 2019 г. М. В. Воронина^а, Е. Н. Бугаева^а, Д. М. Васильев^а, А. П. Кабанова^{а, б}, А. П. Баранник^б,
М. М. Шнейдер^б, Е. Е. Куликов^с, А. А. Корженков^{д, е}, С. В. Тошаков^{с, д},
А. Н. Игнатов^а, К. А. Мирошников^{а, б, *}

^аИсследовательский центр “ФитоИнженерия”,
с. Рогачево, Московская обл., 141880 Россия

^бИнститут биоорганической химии им. М.М. Шелякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, 117997 Россия

^сИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

^дБалтийский федеральный университет им. И. Канта,
Калининград, 236041 Россия

^еНациональный исследовательский центр “Курчатовский институт”,
Москва, 123182 Россия

*e-mail: kmi@ibch.ru

Поступила в редакцию 06.02.2019 г.

После доработки 04.03.2019 г.

Принята к публикации 29.03.2019 г.

Бактериофаги пектобактерий, вызывающих заболевания картофеля (черную ножку и мягкую гниль), – сравнительно малоизученная группа фагов, которые имеют перспективы для технологических приложений в целях предотвращения потерь товарного и семенного картофеля. В настоящей статье представлена характеристика нового подовируса PP16, инфицирующего широкий спектр штаммов *Pectobacterium carotovorum*. По строению своего генома бактериофаг PP16 относится к отдельной филогенетической ветви рода *Phimunavirus* подсемейства *Autographivirinae*. Бактериофаг PP16 эффективно ингибирует развитие инфекции *in vitro* и *in planta*. Проведенный полевой эксперимент по обработке бактериофагом PP16 посадочного материала картофеля показал значительное повышение всхожести растений.

Ключевые слова: бактериофаг, *Pectobacterium*, геномика, таксономия, биозащита

DOI: 10.1134/S0026365619040116

Грамотрицательные бактерии порядка *Enterobacteriales*, недавно выделенные в отдельное семейство *Pectobacteriaceae* (Adeolu et al., 2016), распространены в почвенной микробиоте и относятся к фитопатогенам, входящим в десятку наносящих наибольший урон в мировом сельском хозяйстве (Mansfield et al. 2012). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) – наиболее распространенный в глобальном масштабе представитель этого семейства, обладающий наиболее широким спектром поражаемых видов растений (Pérombelon, 2002). На картофеле (*Solanum tuberosum*) Pcc вызывает черную ножку вегетирующих растений и мягкую (мокрую) гниль клубней во время хранения урожая и семенного материала. В отличие от похожих по вызываемым болезням фитопатогенов из родов *Pectobacterium* и *Dickeya*, обладаю-

щих низким внутривидовым разнообразием, бактерии Pcc высоко вариабельны (Pérombelon, 2002). По мере получения детальной информации о вирулентности, спектре растительных хозяев, температурных оптимумах патогенеза и, в особенности, деталях строения генома, некоторые группы штаммов, ранее относившихся к Pcc, были определены в новые виды и подвиды – *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* (Gardan et al., 2003), *P. carotovorum* gsp. *maceratum* (Shirshikov et al., 2018), *P. peruvienne* (Waleron et al., 2018), *P. polaris* (Dees et al., 2017), *P. punjabense* (Sarfraz et al., 2018). В связи с ограничениями использования антибиотиков в сельском хозяйстве разработка альтернативных методов борьбы с бактериозами растений представляется актуальной. В частности, рассматриваются стратегии контроля фитопато-

генных бактерий с помощью специфических бактериофагов (Balogh et al., 2010).

Целью работы было провести поиск высоко активных литических бактериофагов, инфекционных по отношению к патогенным штаммам *Rss*, и дать исчерпывающее описание их свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования был штамм *Pectobacterium carotovorum* F002 – хозяин изучаемого бактериофага.

Культуральные методы. Для культивирования штаммов бактерий родов *Pectobacterium* и *Dickeya* использовали стандартную среду LB и агаризованную среду LB (концентрация агара 1.5%). В качестве верхнего слоя при титровании фагов использовали ту же среду с 0.6% агара (Sambrook et al., 1989). Инкубацию планктонных и поверхностных культур проводили при 26–28°C.

Для наращивания фага в жидкой культуре 50 мл бульона LB инокулировали 1% (об.) ночной культуры *Rss* штамма F002 и растили до середины логарифмической фазы (оптическая плотность при 600 нм от 0.5 до 0.6) при интенсивном перемешивании. Выросшую культуру инокулировали единичной бляшкой фага и инкубировали до проявления признаков лизиса. Затем добавляли 0.5% (об.) хлороформа, энергично встряхивали и через 1 ч лизаты центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин для удаления бактериальных фрагментов.

Очистка бактериофага PP16. После обработки хлороформом лизат фильтровали через мембранный фильтр с порами 0.22 мкм (“Millipore”, США), обрабатывали ДНКазой I (0.5 мг/мл, 60 мин). Фаг очищали ультрацентрифугированием (66000 g, 120 мин, 4°C, ротор Beckman SW28) в ступенчатом градиенте плотности CsCl 0.5–1.7 г/мл. Суспензию фага PP16 диализовали против фагового буфера (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM MgSO₄). Препарат очищенного фага хранили при 4°C.

Электронная микроскопия. Суспензию очищенного бактериофага наносили на сетки и контрастировали 1% водным раствором уранилацетата (Ackermann, 2009). Изображения получали с помощью электронного микроскопа JEOL JEM-CX100 (“JEOL”, Япония) с ускоряющим напряжением 100 кВ.

Определение инфекционного спектра бактериофага. Для определения способности фага PP16 инфицировать клетки бактерии-хозяина, по 5 мкл серийных разведений от 10² до 10⁸ БОЕ/мл очищенного бактериофага наносили на чашку Петри с двуслойным агаром, инокулированным соответствующим штаммом. Затем чашки инкубировали при 37°C в течение ночи. Результаты регистрировали следующим образом: (–) – отсутствие

роста фагов; (+) – зона ингибирования роста бактерий, разделяющаяся на отдельные зоны-бляшки при разведении препарата фага.

Определение параметров инфекции. Для оценки скорости адсорбции фаговых частиц штамм *P. carotovorum* F002 культивировали в жидкой среде LB до OD₆₀₀ ~ 0.4, инфицировали фагом PP16 с множественностью инфекции (МОИ) 0.1. Далее каждые 3 мин с начала инфицирования отбирали аликвоты 100 мкл и переносили в 800 мкл среды LB/50 мкл хлороформа. После лизиса бактерий смесь центрифугировали (10000 g) и титровали для определения количества свободных частиц фага. Одностадийные кривые роста популяции фага определяли в соответствии с рекомендациями (Clokic, Kropinski, 2009). Стабильность фага оценивали путем инкубации суспензии фага с концентрацией 10⁷ БОЕ/мл при различных температурах или в различных буферных растворах (20 mM Tris-HCl/20 mM цитрат Na/20 mM фосфат Na) доведенных до pH 4–9 с помощью NaOH).

Генотипирование фагочувствительных штаммов. Для определения генетического родства бактерий, инфицируемых фагом PP16, проводили фингерпринтинг геномов методом BOX-PCR (Martin et al., 1992). Геномную ДНК бактерий выделяли экстракцией фенолом (Sambrook et al., 1989), оценивали ее концентрацию по поглощению при 260 нм (NanoPhotometer NP60, “Implen”, Германия) и проводили ПЦР. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Твин-20, 2.5 mM MgCl₂, dNTP (“GE Healthcare”, США) (0.4 mM каждый), 0.6 мкМ праймер BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), 80 нг геномной ДНК, 1.0 U *Taq*-полимеразы (“Евроген”, Россия). Амплификацию осуществляли по схеме: начальная денатурация ДНК – 5 мин при 95°C, следующие 40 циклов: 95°C, 1 мин; 52°C, 1 мин; 72°C, 2 мин; завершающий цикл – 72°C, 5 мин. Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в 1.5% агарозном геле (80 В, буфер 1× TAE). В качестве маркера молекулярных масс был использован HyperLadder 1 kb (“Bioline”, Великобритания). Фингерпринты документировали и сравнивали с помощью системы Quantum-ST5 (“Vilber Lourmat”, Франция).

Выделение ДНК и секвенирование генома бактериофага PP16. Геномную ДНК бактериофага выделяли экстракцией фенолом (Clokic, Kropinski 2009) и фрагментировали ультразвуком. Фрагментные библиотеки конструировали с помощью набора Nebnext Ultra DNA library prep kit (“New England Biolabs”, США) и секвенировали на платформе Illumina MiSeq™ (США) с парными прочтениями длиной 150 п.н. Данные секвенирования фильтровали программой CLC Genomics Workbench 8.5 (“Qiagen”, Германия), перекрываю-

шиеся прочтения соединяли программой SeqPrep tool (<https://github.com/jstjohn/SeqPrep>). Сборку генома проводили программой Spades 3.8.0 (Bankevich et al., 2012). Физические концы генома определяли секвенированием по Сэнгеру с помощью секвенатора ABI Prism 3130 (“Applied Biosystems”, США).

Аннотация генома и сравнительная геномика. Поиск открытых рамок считывания выполняли при помощи программы GeneMarkS (Besemer et al., 2001). Функции открытых рамок считывания (ORF) предсказывали путем выравнивания против последовательностей из базы данных NCBI nr программой PSI-BLAST (Altschul et al., 1997), поиск консервативных доменов выполняли программой HMMER (Finn et al., 2011). Поиск промоторных последовательностей в геноме осуществляли с помощью программы PHIRE (Lavigne et al., 2004). Филогенетическая классификация бактериофага была выполнена с помощью сервера VICTOR (Meier-Kolthoff, Göker, 2017). Значение средней нуклеотидной идентичности определяли с помощью скрипта ani.rb (<https://github.com/lmrodriguezr/enveomics>).

Депонирование нуклеотидных последовательностей в ГенБанк. Аннотированная полногеномная последовательность бактериофага PP16 (vM_PccP_PP16) депонирована в NCBI GenBank под номером KX278418.1.

Тестирование профилактического и лечебного воздействия бактериофага PP16 *in planta*. Эффект подавления фагом PP16 размягчения ткани картофеля, вызванного *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* F002, выявляли опытами на срезах клубней (Czajkowski et al., 2015). Клубни картофеля сорта Айл оф Джура (“Cygnal Potato Breeders LTD”, Великобритания и ООО “Новый картофель”, Россия) поверхностно стерилизовали 70% этанолом в течение 3–5 мин, промывали водой и высушивали фильтровальной бумагой. Стерильным ножом клубни нарезают на диски толщиной 0.7 см. В каждом диске вырезают три углубления (5 × 5 × 5 мм) и вносят в них по 50 мкл суспензии, содержащей 10⁶ КОЕ/мл Pcc F002 и 10⁶ БОЕ/мл PP16 (МОИ = 1). В качестве отрицательного контроля использовали 50 мкл воды, а в качестве положительного контроля 50 мкл суспензии, содержащей только Pcc F002 в той же концентрации. Защитный эффект фагов измеряли после инкубации в течение 72 ч при 26°C и 100% относительной влажности, оценивая диаметр мацерированной ткани в месте инокуляции. Опыт закладывали в трех повторностях на дисках из двух разных клубней.

Полевой эксперимент по обработке бактериофагом семенного материала. В исследовании использовали среднеустойчивый к бактериозам сорт картофеля Айл оф Джура, свободный от вирусной и грибной инфекций. Обработку семенных клуб-

ней картофеля проводили непосредственно перед посадкой путем распыления на клубни водного раствора, содержащего: фунгицид Эместо Квантум (“Bayer”, Германия) 40 мл/л; микроудобрение Изагри (Россия) 200 мл/л, лизат фага PP16, профильтрованного через 0.22 мкм фильтр, в конечной концентрации 10⁸ БОЕ/мл. В контроле препарат бактериофага не добавляли. В предварительных экспериментах было установлено отсутствие негативного воздействия фунгицида и микроудобрения в рабочей концентрации на жизнеспособность и вирулентность бактериофага.

Эффективность действия препарата бактериофагов определяли по степени снижения развития бактериоза картофеля при оценке популяций патогенных бактерий на клубнях микробиологическими, молекулярными методами, а также по влиянию на всхожесть клубней и урожайность растений в фазе технической спелости. Место проведения эксперимента: с. Рогачево Дмитровского р-на Московской обл., Россия. Географические координаты – 56°26′00″ с.ш., 37°09′20″ в.д. Почва опытного участка дерново-подзолистая, легкосуглинистая, содержание гумуса 2.3%, подвижного фосфора 220 мг/кг, обменного калия 180 мг/кг; pH 5.7. Количество бактерий на 1 г почвы – 3.0 × 10¹⁰ КОЕ/г; параметры определяли согласно рекомендациям (Ягодин и соавт., 2002). В почве присутствует фоновое количество пектолитических бактерий (Humphris et al., 2015).

Посадка опыта произведена 27 мая, уборка – 15 сентября 2017 г. Делянки двухрядковые, количество высаженных клубней на делянке – 66 шт., повторность – двукратная. До посадки на поле внесены минеральные удобрения из расчета: азот : фосфор : калий (90 : 100 : 200) кг действующего вещества/га. Ширина междурядий – 90 см, расстояние между клубнями в ряду – 27 см. В период вегетации проведено 7 обработок фунгицидами, микроудобрениями и инсектицидами. Количественную оценку содержания *Pectobacterium* sp. (без дифференциации на виды) проводили по стандартному протоколу ПЦР в реальном времени (RT-PCR) (Humphris et al., 2015).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Свойства бактериофага PP16. Бактериофаг PP16 был выделен нами в 2012 г. из сточных вод в Московской области с использованием высоковирулентного штамма Pcc F002 (PB69), NCBI номер NZ_PDVY00000000.1 (Shirshikov et al., 2018) в качестве бактериального хозяина. Электронная микроскопия негативного контрастирования выявила морфологию вирусных частиц, характерную для семейства *Podoviridae*, с икосаэдрическим капсидом диаметром ~60 нм и коротким хвостом длиной ~15 нм (рис. 1). Таким образом,

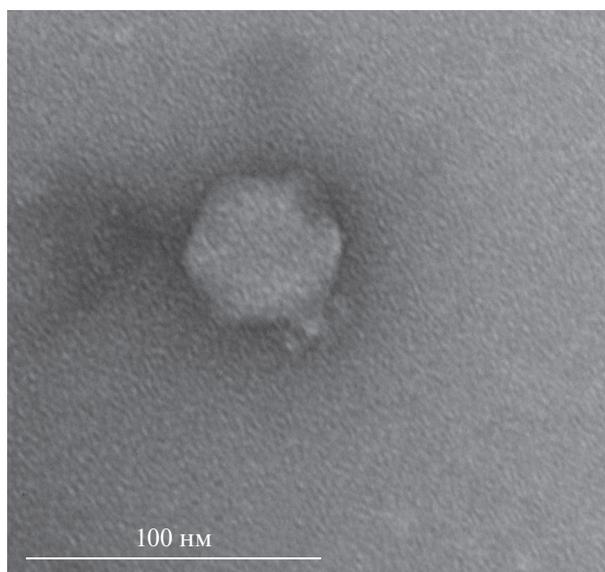


Рис. 1. Электронно-микроскопическое изображение фага PP16, негативно контрастированного 1% уранилацетатом. Увеличение $\times 150000$. Шкала 100 нм.

согласно универсальной номенклатуре вирусов бактерий (Lavigne et al., 2008), бактериофаг PP16 следует именовать νB_{PscP_PP16} . Обращает на себя внимание наличие выступов вокруг хвостового отростка, представляющих собой адсорбционный аппарат бактериофага (рис. 1). Такие выступы характерны для фагов родов *KP34virus* (Eriksson et al., 2015) и *Phimunavirus* (Buttimer et al., 2018) подсемейства *Autographivirinae*.

Бактериофаг PP16 эффективно инфицирует штамм Psc F002, практически полностью адсорбируясь на клетках бактерий в течение 5 мин (рис. 2а) при 26°C. Фаг лизирует клетки полностью в течение 1 ч, при этом происходит полное просветление культуры клеток и формирование потомства фага (порядка 60 частиц на клетку) (рис. 2б). В течение 3 ч *in vitro* не происходит заметного роста фагоустойчивых мутантов клеток.

Инфекционный спектр бактериофага PP16. На газоне бактерий Psc штамма F002 и других чувствительных бактерий фаг PP16 образует прозрачные негативные колонии размером 1–2 мм, окруженные мутным ореолом. Наличие подобного ореола обычно указывает на присутствие в частице бактериофага ферментов, осуществляющих деградацию липополисахаридов клеточной стенки бактерий. Бактериофаг проявляет инфекционность по отношению к 20 из 42 (47%) протестированных штаммов пектолитических бактерий (табл. 1). Инфекционный диапазон включает в себя бактерии *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (18 из 23, или 78%) и 2 из 3 штаммов *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* (Pcb). Пектолитические патогены *P. atrosepticum* (Pat), *P. parmentieri* (Ppa), *Dickeya*

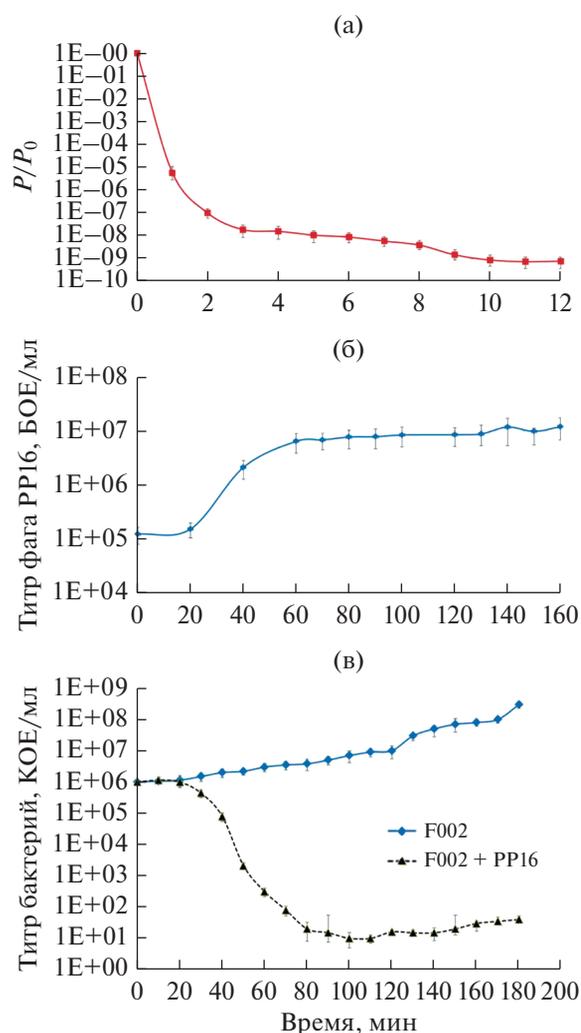


Рис. 2. Биологические свойства фага PP16 при инфекции пектобактерий штамма Psc F002. Эксперименты проведены в жидкой среде LB при 26°C. Множественность инфекции 0.1. а – адсорбция фага; б – одностадийная кривая роста; в – ингибирование популяции бактерий: 1 – контроль (без внесения фага); 2 – внесение фага.

solani (Dso) и *D. dianthicola* (Ddi) устойчивы к действию фага PP16. Генетическое разнообразие штаммов, чувствительных к действию бактериофага PP16, оценивали сравнением ДНК-фингерпринтов, полученных методом ВОХ-PCR (Martin et al., 1992). Этот метод амплификации фрагментов генома бактерий между консервативными межгенными регуляторными элементами ВОХ-А, позволяет оценить филогенетическое родство штаммов разнообразных таксономических групп бактерий. Профили 18 чувствительных к фагу PP16 штаммов Psc показывает принадлежность 16 из них к трем группам (рис. 3), что позволяет сделать вывод о распространенности в Центральной России ограниченного числа генотипов Psc. В каждом профиле ВОХ-фингерприн-

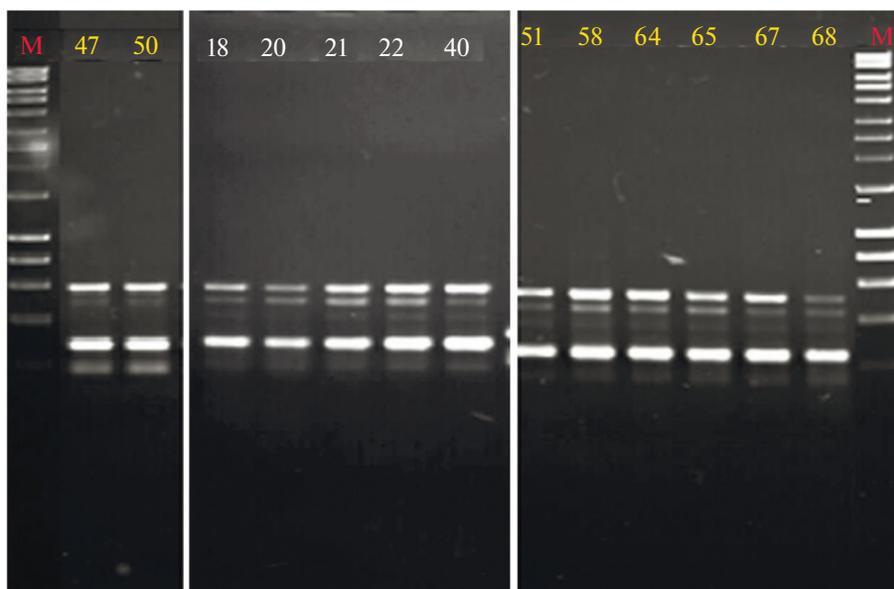


Рис. 3. BOX-фингерпринты геномов бактерий Psc, чувствительных к фагу PP16. Электрофорез в 1.5% агарозном геле с окрашиванием бромидом этидия. Номера штаммов указаны на дорожках. М – маркер HyperLadder 1 kb.

та имеются мажорные полосы размером около 270 и 720 п.н., отличия между группами наблюдаются в количестве и интенсивности минорных полос. Только два штамма – F002 и близкородственный ему по геномной нуклеотидной последовательности F003 – имеют паттерны BOX-фингерпринтов, отличные от этих трех групп. Интересно, что все инфицируемые фагом PP16 представители таксона Psc относятся к группе штаммов, характерных для Европейской части России и по сходству геномов отнесенных к предполагаемому новому геномовиду *Pectobacterium carotovorum* gsp. *maceratum* (Shirshikov et al., 2018). Коллекционные штаммы, считающиеся типовыми для Psc, к бактериофагу PP16 устойчивы (табл. 1). Несмотря на довольно высокое генетическое родство штаммов, чувствительных к фагу PP16, его инфекционный спектр можно считать широким.

Свойства генома бактериофага PP16. Собранный с 6179-кратным покрытием геном бактериофага PP16 представляет собой линейную двухцепочечную ДНК длиной 44268 п.н. и (Г + Ц) 51.9%. Из депонированных в GenBank геномов бактериофагов довольно высокое сходство последовательности PP16 имеется с геномами аннотированных, но детально не описанных фагов PPWS1 (LC063634.2) (Hirata et al., 2016), PPWS2 (LC375533.1) и BF25/12 (KT240186.1), инфицирующих *P. carotovorum* и *Dickeya* sp. соответственно. Сходство составляет от 77.9 до 87.70% и позволяет отнести PP16 к иному таксономическому виду, по сравнению с вышеупомянутыми вирусами.

Геном фага PP16 имеет организацию, характерную для фагов подсемейства *Autographivirinae* (рис. 4). Линейный геном имеет концевые повторы длиной 365 п.н., не кодирует собственных тРНК. Все 57 предсказанных открытых рамок считывания (ORF) расположены на одной цепи ДНК, функцию 31 (54%) из них можно предсказать анализом последовательности генов и закодированных ими белков. В геноме не было обнаружено генов, характерных для лизогенизации бактерии, то есть инфекционный цикл фага PP16 можно считать литическим. По функциям кодируемых ими белков ORF можно разделить на три группы.

Область ранних генов включает рамки, которые транскрибируются непосредственно после ввода фаговой ДНК в клетку-хозяин. Считается, что эти ORF вовлечены в перенаправление метаболизма клеточных белков на развитие инфекционного цикла фага за счет стимулирования или ингибирования их функций (Roucourt, Lavigne, 2009). Пять рамок, расположенных в области перед геном ДНК-праймазы (PP16_ORF14), высоко консервативны в геномах фагов PPWS1, BF25/12, фагов, отнесенных к роду phiM1-подобных (Buttimer et al., 2018), а также ряда неохарактеризованных подофагов, инфицирующих *P. atrosepticum* – Gaspode (MH807811.1), Lelidair (MH807814.1), Momine (MH807816.1), Nobby (MH807818.1) и Slant (MY817819.1). Другие гены ранней области кодируют белки, участвующие в репликации и репарации ДНК. Положение гена, кодирующего односубъединичную РНК-полимеразу (PP16_ORF37), в конце этой области характерно для представителей родов phiKMV, KP34 и phiM1-подобных

Таблица 1. Инфекционный спектр бактериофага PP16

№	Штамм	Другое обозначение	Год	Место	Вид	Определение таксона	ВОХ группа	PP16
1	F002	PВ69	2012	Московская обл.	Pcc*	NZ_PDYY00000000.1	ND	+
2	F003	PВ70	2012	Московская обл.	Pcc*	NZ_PDYZ00000000.1	ND	+
3	F018		1947	Московская обл.	Pcc*	NZ_PDZV00000000.1	PccI	+
4	F020		2003	Московская обл.	Pcc*	16S	PccI	+
5	F021		2005	Московская обл.	Pcc*	16S	PccI	+
6	F022		1993	Московская обл.	Pcc*	16S	PccI	+
7	F047		1991	Ленинградская обл.	Pcc*	16S	PccII	+
8	F050		1993	Ленинградская обл.	Pcc*	16S	PccII	+
9	F051		2005	Московская обл.	Pcc*	16S	PccIII	+
10	F058		2003	Московская обл.	Pcc*	16S	PccIII	+
11	F064		2005	Московская обл.	Pcc*	16S	PccIII	+
12	F065		2003	Московская обл.	Pcc*	16S	PccIII	+
13	F067		2004	Московская обл.	Pcc*	16S	PccIII	+
14	F068		2005	Московская обл.	Pcc*	16S	PccIII	+
15	F099		2005	Московская обл.	Pcc*	16S	PccIII	+
16	F100		1993	Тверская обл.	Pcc*	16S, PCR	PccI	+
17	F105		2005	Московская обл.	Pcc*	16S	PccIII	+
18	F108		2003	Московская обл.	Pcc*	16S	PccI	+
19	F118		2005	Московская обл.	Pcc*	16S, PCR	PccI	+
20	F132		2005	Московская обл.	Pcc*	16S, PCR	PccI	+
21	F135		1995	Владимирская обл.	Pcc*	NZ_PDZX00000000.1	PccI	+
22	F008		1923	ВКПМ	Pcc	16S, PCR	ND	-
23	F160	NCPPB312	ND	ВКПМ	Pcc	NZ_JQHJ00000000.1	PccIV	-
24	F140		2012	Московская обл.	Pcc	16S, PCR	PccV	-
25	F150		2014	Московская обл.	Pcc	16S, PCR	PccV	-
26	F131		1998	Калужская обл.	Pcc*	NZ_PDZW00000000.1	PccVI	
27	F126		2012	Самарская обл.	Pcb	16S, PCR	PcbI	+
28	F128		2012	Самарская обл.	Pcb	16S, PCR	PcbI	+
29	F152	PВ29	2014	Московская обл.	Pcb	16S, PCR	PcbII	-
30	F012		2010	Воронежская обл.	Dso	NZ_PGOJ000000.1	Dso	-
31	F043		2010	Московская обл.	Dso	16S, PCR	Dso	-
32	F082		1980	Московская обл.	Dso	PCR	Dso	-
33	F097		2011	Калужская обл.	Dso	PCR	Dso	-
34	F119		2011	Тверская обл.	Dso	PCR	Dso	-
35	F156		2014	Московская обл.	Dso	16S, PCR	Dso	-
36	F069		2011	Московская обл.	Ddi	16S, PCR	DdiI	-
37	F077		2002	Тюменская обл.	Ddi	16S, PCR	DdiI	-
38	F085		1979	Московская обл.	Ddi	16S, PCR	DdiII	-
39	F090		1995	Калужская обл.	Ddi	16S, PCR	DdiII	-
40	F162	SCRI1043	ND	Шотландия	Pat	NC_004547	PatI	-
41	F163	21A	1990	Беларусь	Pat	NZ_CP009125	PatII	-
42	F004	PВ72	2012	Московская обл.	Pat	NZ_PDDK00000000.1	PatII	-
43	F041		2011	Московская обл.	Pat	16S, PCR	PatI	-
44	F048		2012	Тверская обл.	Pat	16S, PCR	PatI	-

Таблица 1. Окончание

№	Штамм	Другое обозначение	Год	Место	Вид	Определение таксона	ВОХ группа	PP16
45	F148	PВ20	2013	Московская обл.	Ppa	NZ_PDDJ00000000.1	Ppa	—
46	F149		2013	Тверская обл.	Ppa	16S, PCR	Ppa	—

Примечание. Pcc – *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, Pcc* – штаммы *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, относящиеся к перспективному геномному виду *gsp maceratum* (Shirshikov et al., 2018); Pcb – *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*; Pat – *P. atrosepticum*; Ppa – *P. parmentieri*; Ddi – *Dickeya dianthicola*; Dso – *D. solani*. 16S – проведено секвенирование фрагмента гена 16S рРНК. PCR – определение таксономической принадлежности проведено стандартными диагностическими тестами (Humphris et al., 2015). ND – не определено/неизвестно.

бактериофагов, и отличается от “классических” T7-подобных и SP6-подобных фагов подсемейства *Autographivirinae*.

Гены, кодирующие белки сборки и морфогенеза вириона PP16, также высоко консервативны по аминокислотным последовательностям и положению в геноме (рис. 4). Предсказанная с помощью программы HHPRED структура белка хвостового шипа (PP16_ORF57) характерна для этих компонентов адсорбционного аппарата фагов. В состав фаговых хвостовых шипов часто входят ферментативные домены, разрушающие или модифицирующие внешние полисахариды клеточной стенки бактерий в процессе адсорбции фага. Для PP16_ORF57 нами предсказана деацетилазная активность. Последовательность предсказанных элементов вторичной структуры PP16_ORF57 аналогична белку gp63.1 фага *E. coli* G7C, для которого определена трехмерная структура (Prokhorov et al., 2017). При этом наибольшее сходство аминокислотной последовательности PP16_ORF57 наблюдается не с белками хвостовых шипов близкородственных phiM1-подобных фагов, инфицирующих *P. atrosepticum*, а с белком gp40 филогене-

тически отдаленного фага PP2, инфицирующего *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Lim et al., 2017). Также гены с последовательностью, гомологичной PP16_ORF57, обнаружены в областях профагов геномов различных штаммов *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* и *P. polaris*. Можно предположить, что консервативная последовательность аминокислотных остатков обеспечивает наилучшую стерическую координацию белка хвостового шипа для связывания с цепочками О-полисахаридов именно *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, таким образом, определяя инфекционный диапазон бактериофага.

В касете лизиса фага PP16 закодированы белки, которые осуществляют разрушение клетки хозяина в конце инфекционного цикла. Эндолизин (PP16_ORF56) имеет предсказанный N-концевой трансмембранный домен и может быть отнесен к группе signal–arrest–release (SAR) – эндолизинов. Совместно с белком пинхолином (PP16_ORF55) он обеспечивает проникновение через внутреннюю мембрану бактерии и деградацию пептидогликана клеточной стенки. Продукт первого гена в касете (PP16_ORF54) имеет предсказанную N-кон-

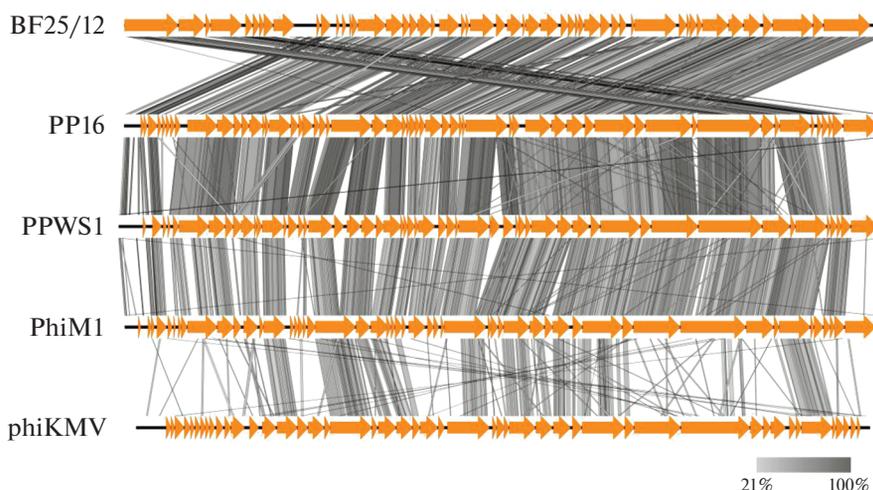


Рис. 4. Сравнительная схема структуры геномов фагов PP16, PPWS1, PhiM1, KP34 и phiKMV. Серым цветом указано соответствие гомологичных участков геномов, насыщенность цвета отражает уровень идентичности последовательностей. Стрелками показаны белок-кодирующие гены.

цевую сигнальную последовательность и С-концевой трансмембранный домен, что относит его к классу и-спанинов или белков типа Rz1A (Young, 2014). Такое строение кассеты лизиса отмечено у phiM1-подобных фагов *Pectobacterium* (Buttimer et al., 2018) и KP34-подобных фагов *Klebsiella* (Eriksson et al., 2015). Однако следует отметить наличие дополнительного неперекрывающегося гена (PP16_ORF53), кодирующего белок с предсказанным трансмембранным доменом. Этот небольшой белок также может быть частью кассеты лизиса, выполняя роль цитоплазматического и-спанина (Rz-белка). В этой же позиции белки с заметным сходством аминокислотной последовательности закодированы в геномах фагов BF25/12 (BF2512_05), Momine (AXY81930.1), Nobby (AXY82036.1) и отнесенного к роду *Phimunavirus* фага Peat1 (YP_009224684.1). Участие этого белка в процессе лизиса хозяина требует экспериментального подтверждения, однако на основании биоинформационного анализа можно предположить, что наличие дополнительного гена в модуле лизиса характерно для phiM1-подобных фагов.

Сравнительная геномика. Для определения положения фага PP16 в подсемействе *Autographivirinae* был проведен филогенетический анализ полных геномных нуклеотидных последовательностей при помощи программы VICTOR с использованием формулы D4 (Meier-Kolthoff, Göker, 2017) (рис. 5). Полученная филограмма показывает, что фаги *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* PP16, PPSW1, PPSW2, а также фаг *Dickeya* BF25/12 формируют отдельную группу на ветви, также включающей PhiM1-подобные фаги (Buttimer et al., 2018). Эта ветка располагается довольно близко от фагов рода *KP34virus* и группы, включающей фаги *Vibrio* VP93 и *Pantoea* LIMelight, которые были ранее описаны как эволюционно родственные группе *KP34virus* (рис. 5). Филогенетический анализ был также проведен с аминокислотными последовательностями генов, составляющих геномы фагов. Результат этого анализа представляет собой дерево, практически аналогичное по топологии предыдущему, но с меньшей достоверностью. Филогенетический анализ, основанный на сходстве белков, показывает, что фаг PP16 имеет достаточно близкое эволюционное родство с PhiM1-подобными фагами. Формирование отдельной ветви рода *Phimunavirus*, включающей PP16, PPSW1, PPSW2 и BF25/12, на основании средней идентичности нуклеотидных последовательностей геномов (от 77.9 до 87.7%), можно объяснить таксономическими различиями бактерий-хозяев. Все бактериофаги, отнесенные к роду *Phimunavirus*, инфицируют *P. atrosepticum* — родственный Pcc вид, но имеющий ряд отличий в спектре вирулентности, биохимических и генетических свойствах (Adeolu et al., 2016; Pérombelon, 2002). При-

способление к метаболизму имеющих общее эволюционное происхождение, но не одинаковых бактериальных хозяев привело к появлению различий в последовательности, но не общей архитектуре генома у фагов PP16, PPSW1, PPSW2 и BF25/12.

Защитное действие бактериофага при инфекции ткани клубня картофеля. Способность бактериофага PP16 влиять на развитие мягкой гнили при инокуляции дисков картофельных клубней штаммом Pcc F002 оценивали сравнением диаметра мацерированной ткани вокруг точки инокуляции через 72 ч в отсутствие и в присутствии бактериофага. При совместном нанесении патогенных бактерий и фага (MOI = 1) наблюдали достоверное 4-кратное уменьшение размера области поражения по сравнению с положительным контролем (рис. 6). Таким образом, бактериофаг PP16 способен эффективно замедлять развитие мягкой гнили ткани картофеля, вызванной штаммом Pcc F002.

Стимулирующее действие бактериофага в полевом эксперименте. Погодные условия вегетационного периода 2017 г. были благоприятными для развития бактериальных и грибных болезней картофеля. Май и июнь были холодными с большим количеством осадков. Период от посадки до появления всходов по этой причине составил 50 дней, что вдвое дольше обычного. Вплоть до третьей декады июля отмечалась избыточная влажность почвы.

Первоначальный инфекционный фон Pcc в посадочном материале составлял в среднем 1.24×10^3 КОЕ/клубень. В собранном урожае на здоровых клубнях контрольного варианта данный показатель составил 2.5×10^6 КОЕ/клубень, достигая концентрации, достаточной для проявления симптомов мягкой гнили (Pérombelon, 2002). В опыте с применением обработки бактериофагом PP16 концентрация бактерий Pcc в урожае была ниже в 10 раз и составила 2.32×10^5 КОЕ/клубень (рис. 7). Аналогично эксперименту на картофельных дисках, можно предположить, что ингибирование роста, но не полная элиминация популяции Pcc связаны с возникновением фагоустойчивых мутантов или наличием в микробном сообществе штаммов *P. carotovorum*, невосприимчивых к действию фага PP16 и продолжающих размножение в течение сезона вегетации. На фоне аномально низкой всхожести клубней в контроле, вызванной длительным периодом пребывания ростков в почве и развитием комплекса болезней до всходов, очень выраженным оказывается эффект стимулирования всхожести в случае обработки фагом — более, чем в 5 раз (85% по сравнению с 15% в зараженном контроле). Урожайность в контроле составила 0.7 кг/м², в опытном варианте 4.65 кг/м²; соответственно, прибавка к урожайности контроля составила 567.5%. Столь высокая биологиче-

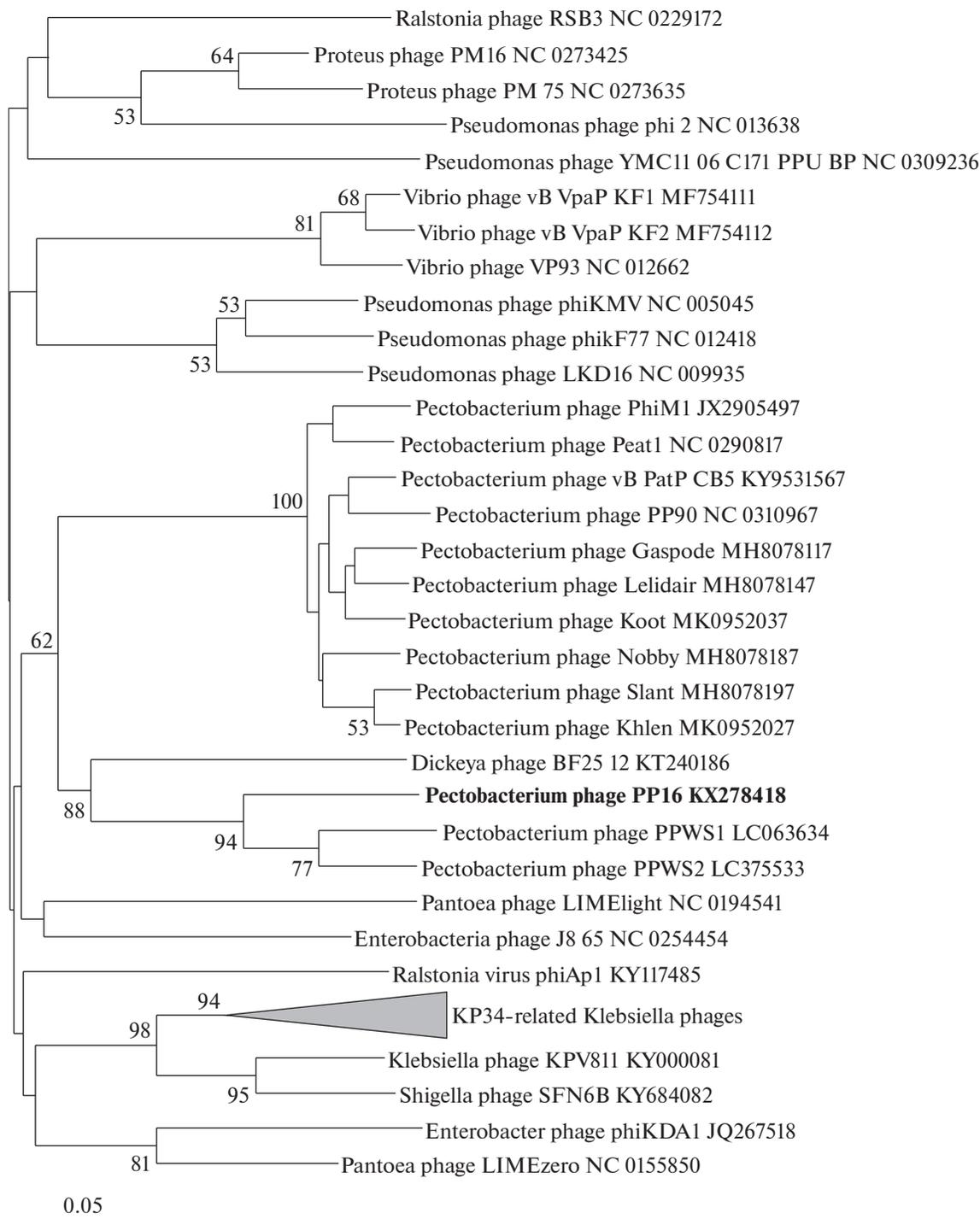


Рис. 5. Филогенетическое древо вирусов семейства *Autographivirinae*, наиболее близких к вирусу PP16, установленное на основании полных нуклеотидных последовательностей при помощи сервиса VICTOR. Расстояния между геномами были получены при помощи полногеномного выравнивания, древо построено в программе FASTME методом минимальной эволюции, визуализировано в программе FigTree. Значения достоверности установлены при помощи 100 псевдо-репликаций и указаны для узлов, имеющих достоверность выше 50%. Ветвь фагов рода *Kp34virus* и родственных им свернута для улучшения восприятия древа. Шкала показывает рассчитанное расстояние между геномными последовательностями.

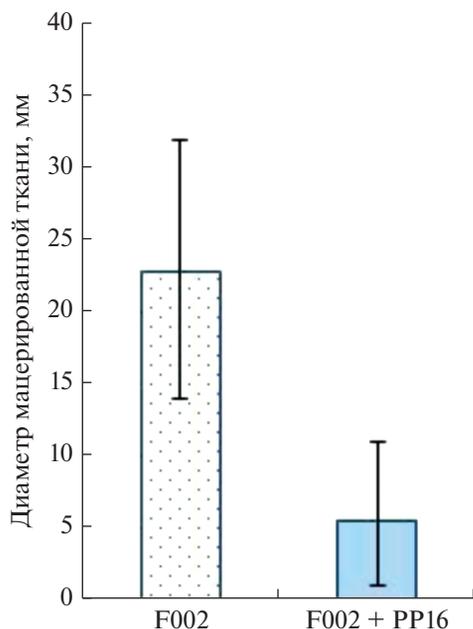


Рис. 6. Защитное действие бактериофага PP16 при совместной инокуляции ткани картофеля бактериофагом и штаммом *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* F002 (справа) по сравнению с инокуляцией только бактерий штаммом F002 (слева). Эффект оценивали по диаметру мацерированной ткани в месте инокуляции после инкубации в течение 72 ч при 26°C.

ская эффективность не может быть объяснена прямым действием фагового препарата на патогены, т.к. фаг PP16 не может быть инфекционным против всех представителей бактериального сообщества, ассоциированных с мягкой гнилью картофеля, и популяция пектобактерий на клубнях нового урожая также значительна.

В данный момент мы не можем предложить обоснованную гипотезу для объяснения влияния бактериофага на всхожесть растений и прибавку урожая картофеля. Однако очевидно, что стратегия обработки бактериофагами приводит к положительным результатам не только в случае защиты картофеля от мягкой гнили клубней при хранении собранного урожая, но и в полевых экспериментах. В дальнейшем исчерпывающе охарактеризованный бактериофаг *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* PP16 может быть использован при конструировании перспективных препаратов (коктейлей) бактериофагов для комплексного биоконтроля заболеваний (мягкой гнили и черной ножки) картофеля.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование, кроме исследования морфологии бактериофага, выполнено при поддержке гранта РНФ № 16-16-00073.

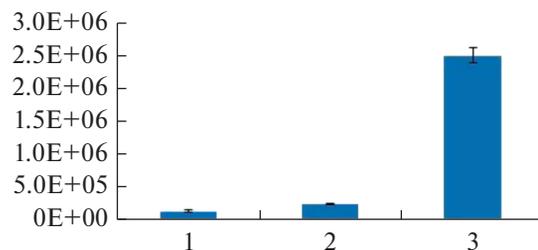


Рис. 7. Защитное действие бактериофага PP16 в поле-вом опыте. Численность популяции *Pectobacterium* spp.: 1 – клубни перед посадкой (до обработки), 2 – урожай клубней в варианте с обработкой бактериофагом, 3 – урожай клубней в контроле, без обработки бактериофагом.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит материалов каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ягодин Б.А., Жуков Ю.П., Кобзаренко В.И. Агрохимия / Под ред. Ягодина Б.А. М.: Колос, 2002. 584 с.
- Ackermann H.-W. Basic Phage Electron Microscopy // Bacteriophages: Methods and Protocols. 2009. V. 1. P. 113–126. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6>
- Adeolu M., Alnajjar S., Naushad S., Gupta R.S. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: Proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 5575–5599. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Balogh B., Jones J.B., Iriarte F.B., Momol M.T. Phage therapy for plant disease control // Curr. Pharm. Biotechnol. 2010. V. 11. P. 48–57. <https://doi.org/10.2174/138920110790725302>
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Pribelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // J. Computat. Biol. 2012. V. 19. P. 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Besemer J., Lomsadze A., Borodovsky M. GeneMarkS: A self-training method for prediction of gene starts in micro-

- bial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29. P. 2607–2618. doi 10.1093/nar/29.12.2607
- Buttimer C., Lucid A., Neve H., Franz C.M.A.P., O'Mahony J., Turner D., Lavigne R., Coffey A. *Pectobacterium atrosepticum* phage VB_PatP_CB5: a member of the proposed genus 'Phimunavirus' // *Viruses*. 2018. V. 10. pii: E394. <https://doi.org/10.3390/v10080394>
- Clokic M.R.J., Kropinski A.M. Bacteriophages: Methods and Protocols. V. 1: Isolation, Characterization, and Interactions // *Methods in Molecular Biology*. Humana press, 2009. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6>
- Czajkowski R., Ozymko Z., de Jager V., Siwinska J., Smolarska A., Ossowicki A., Narajczyk M., Lojkowska E. Genomic, proteomic and morphological characterization of two novel broad host lytic bacteriophages ФPD10.3 and ФPD23.1 infecting pectinolytic *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. // *PLoS One*. 2015. V. 10. Article e0119812. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119812>
- Dees M.W., Lysøe E., Rossmann S., Perminow J., Brurberg M.B. *Pectobacterium Polaris* sp. nov., isolated from potato (*Solanum tuberosum*) // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 5222–5529. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002448>
- Eriksson H., Maciejewska B., Latka A., Majkowska-Skrobek G., Hellstrand M., Melefors Ö., Wang J.-T., Kropinski A.M., Drulis-Kawa Z., Nilsson A.S. A suggested new bacteriophage genus, 'Kp34likevirus', within the *Autographivirinae* subfamily of *Podoviridae* // *Viruses*. 2015. V. 7. P. 1804–1822. <https://doi.org/10.3390/v7041804>
- Finn R.D., Clements J., Eddy S.R. HMMER Web Server: Interactive Sequence Similarity. Searching // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. Suppl. 2. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr367>
- Gardan L., Gouy C., Christen R., Samson R. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003. V. 53 P. 381–391. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02423-0>
- Hirata H., Kashihara M., Horiike T., Suzuki T., Dohra H., Netsu O., Tsuyumu S. Genome Sequence of *Pectobacterium Carotovorum* Phage PPWS1, Isolated from Japanese Horse-radish [*Eutrema Japonicum* (Miq.) Koidz] Showing Soft-Rot Symptoms. // *Genome Announcements*. 2016. V. 4. № 2. pii: e01625-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01625-15>
- Humphris S.N., Cahill G., Elphinstone J.G., Kelly R., Parkinson N.M., Pritchard L., Toth I.K., Saddler G.S. Detection of the bacterial potato pathogens *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. using conventional and real-time PCR // *Methods in Molecular Biology*. Clifton, N.J., 2015. P. 1–16. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2620-6_1
- Lavigne R., Sun W.D., Volckaert V. PHIRE, a deterministic approach to reveal regulatory elements in bacteriophage genomes // *Bioinformatics*. 2004. V. 20. P. 629–635. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg456>
- Lavigne R., Seto D., Mahadevan P., Ackermann H.-W., Kropinski A.M. Unifying classical and molecular taxonomic classification: Analysis of the *Podoviridae* using BLASTP-based tools // *Rese. Microbiol.* 2008. V. 159. P. 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.03.005>
- Lim J.A., Heu S., Park J., Roh E. Genomic characterization of bacteriophage VB_PcaP_PP2 infecting *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, a new member of a proposed genus in the subfamily *Autographivirinae* // *Arch. Virol.* 2017. V. 162. P. 2441–2444. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3349-6>
- Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer S.V., Machado M.A., Toth I., Salmond G., Foster G.D. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology // *Mol. Plant Pathol.* 2012. V. 13. P. 614–629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- Martin B., Humbert O., Camara M., Guenzi E., Walker J., Mitchell T., Andrew P., Prudhomme M., Alloing G., Hakenbeck R., Morrison D.A., Boulnois G.J., Claverys J.-P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae* // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. P. 3479–3483. <https://doi.org/10.1093/nar/20.13.3479>
- Meier-Kolthoff J.P., Göker M. VICTOR: Genome-based phylogeny and classification of prokaryotic viruses // *Bioinformatics*. 2017. V. 33. P. 3396–3404. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx440>
- Pérombelon M.C.M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis // *Plant Pathol.* 2002. V. 51. P. 1–12. <https://doi.org/10.1046/j.0032-0862.2001>
- Prokhorov N.S., Riccio C., Zdorovenko E.L., Shneider M.M., Browning C., Knirel Y.A., Leiman P.G., Letarov A.V. Function of bacteriophage G7C esterase tailspike in host cell adsorption // *Mol. Microbiol.* 2017. V. 105. P. 385–398. <https://doi.org/10.1111/mmi.13710>
- Roucourt B., Lavigne R. The role of interactions between phage and bacterial proteins within the infected cell: a diverse and puzzling interactome // *Environ. Microbiol.* 2009. V. 11. P. 2789–2805. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02029.x>
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 479 p.
- Sarfraz S., Riaz K., Oulghazi S., Cigna J., Sahi S.T., Khan S.H., Faure D. *Pectobacterium punjabense* sp. nov., isolated from blackleg symptoms of potato plants in Pakistan // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. V. 68. P. 3551–3556. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003029>
- Shirshikov F.V., Korzhenkov A.A., Miroshnikov K.K., Kabanova A.P., Barannik A.P., Ignatov A.N., Miroshnikov K.A. Draft genome sequences of new genomospecies “*Candidatus Pectobacterium maceratum*” strains, which cause soft rot in plants // *Genome Announc.* 2018. V. 6. Article e00260-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00260-18>
- Waleron M., Misztak A., Waleron M., Franczuk M., Wielgomas B., Waleron K. Transfer of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strains isolated from potatoes grown at high altitudes to *Pectobacterium peruvienne* sp. nov. // *Syst. Appl. Microbiol.* 2018. V. 41. P. 85–93. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2017.11.005>
- Young R. Phage lysis: Three steps, three choices, one outcome // *J. Microbiol.* 2014. V. 52. P. 243–258. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4087-z>

Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Bacteriophage PP16 Perspective for Biocontrol of Potato Soft Rot

M. V. Voronina¹, E. N. Bugaeva¹, D. M. Vasiliev¹, A. P. Kabanova^{1,2}, A. P. Barannik², M. M. Shneider², E. E. Kulikov³, A. A. Korzhenkov^{4,5}, S. V. Toschakov^{3,4}, A. N. Ignatov¹, and K. A. Miroshnikov^{1,2,*}

¹*PhytoEngineering Research Center, Rogachevo, Moscow region, 141880 Russia*

²*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

³*Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

⁴*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236041 Russia*

⁵*Kurchatov Institute, Moscow, 123182 Russia*

**e-mail: kmi@ibch.ru*

Received February 6, 2019; revised March 4, 2019; accepted March 30, 2019

Abstract—Phages of the phytopathogenic *Pectobacteriaceae* species causing black leg and soft rot of potato were investigated. These phages are promising as bioprotection agents to prevent the loss of seed and commercial potatoes. The present work characterizes a new podovirus PP16, infecting a broad range of *Pectobacterium carotovorum* strains. Based on its genomic composition, phage PP16 was assigned to a separate phylogenetic branch of the genus *Phimunavirus*, subfamily *Autographivirinae*. Bacteriophage PP16 efficiently inhibited development of pectobacterial infection both *in vitro* and *in planta*. The field experiment demonstrated a substantial increase of plant germination after the treatment of seed potato with phage PP16.

Keywords: bacteriophage, *Pectobacterium*, genomics, taxonomy, bioprotection