

**ACADEMIA DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI**

**Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor**

Cu titlu de manuscris

C.Z.U. 632.937.15:634.10

**SAMOILOVA ANNA**

**APLICAREA BACTERIOFAGILOR *ERWINIA AMYLOVORA*  
ÎN COMBATEREA FOCULUI BACTERIAN AL  
CULTURILOR POMICOLE**

**411.09. Protecția plantelor**

**Autoreferatul**

**tezei de doctor în științe biologice**

**Chișinău, 2016**

Teza a fost elaborată în Laboratorul de Fitopatologie și Biotehnologie al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al Academiei de Științe a Moldovei

**Conducător științific:**

**VOLOȘCIUC Leonid**, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător

**Referenți oficiali:**

1. **BURȚEVA Svetlana**, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător
2. **NICOLAEV Arcadie**, doctor în științe biologice, conferențiar universitar

**Componența consiliului științific specializat:**

1. **VOINEAC Vasile**, *președinte*, doctor habilitat în științe agricole, profesor universitar
2. **TODIRAȘ Vladimir**, *secretar științific*, doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător
3. **BALAN Valerian**, doctor habilitat în științe agricole, profesor universitar
4. **CROITORU Nichita**, doctor în științe agricole, conferențiar universitar
5. **CALAȘEAN Iurie**, doctor în științe agricole, conferențiar cercetător

Susținerea va avea loc la ”28” iunie 2016, ora 14.00 în ședința Consiliului științific specializat D 10.411.09–01 în cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al AȘM, sala de conferințe, et. 2, MD 2002, str, Pădurii 20, Chișinău, tel: (0373 22) 770447, fax: (0373 22) 779641

Teza de doctor și autoreferatul pot fi consultate la biblioteca Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al AȘM și la pagina web a CNAA ([www.cnaa.md](http://www.cnaa.md)).

Autoreferatul a fost expediat la ”24” mai 2016

Secretar științific al Consiliului științific specializat,  
**Todiraș Vladimir**, doctor habilitat în științe biologice,  
conferențiar cercetător

semnătura

Conducător,  
**Voloșciuc Leonid**, doctor habilitat în științe biologice,  
profesor cercetător

semnătura

Autor,  
**Samoilova Anna**

semnătura

(© Samoilova Anna, 2016)

## REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

**Actualitatea temei:** Focul bacterian al culturilor pomicele atacă plantele din familia rozaceae, provocând un prejudicii serioase plantațiilor de gutui, păr și măr. În SUA pierderile cauzate de această boală ating 100 mln de dolari anual [21]. În România, unde boala a fost înregistrată în 1992, doar din anul 2004 până în 2006 suprafața plantațiilor atacate de focul bacterian a crescut cu 5,3% [19]. În anii 1990 tulpini virulente ale patogenului de foc bacterian al culturilor pomicele, bacteria *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. a fost depistată și în Republica Moldova [3,8].

**Descrierea situației în domeniul de cercetare și identificarea problemelor de cercetare.** Combaterea focului bacterian al culturilor pomicele constă în aplicarea unui complex de măsuri agrotehnice, chimice, genético- ameliorative îndreptate spre diminuarea prezenței patogenului în livezi și în prevenirea infectării cu acesta.

Unul din mijloacele de combatere biologică a focului bacterian îl constituie bacteriofagii, care lizează celulele bacteriilor *E. amylovora*. Principalul avantaj al bacteriofagilor în comparație cu alte mijloace de combatere a bacteriozelor constă în faptul că ei sunt paraziți obligați ai bacteriilor și în același timp ei reprezintă un component natural ai ecosistemelor. Astfel, ei pot fi utilizați în scopuri de profilactice și reținere a dezvoltării focului bacterian la toate fazele de creștere a plantei. În Europa și America au fost izolate tulpini de bacteriofagi virulenți față de bacteriile *E. amylovora*. În 2014 în Italia, Mazzucchi și au înregistrat un brevet privind aplicarea bacteriofagului M9 contra patogenului în livadă în calitate de metodă alternativă al tratărilor chimice [25]. În Republica Moldova lucrări de izolare și identificare a bacteriofagilor bacteriei *E. amylovora* nu au fost efectuate. Astfel, datele privind diversitatea specifică și virulența izolatelor locale de bacteriofagi, precum și cunoștințele despre interacțiunea microorganismelor din coronamentul plantelor lipsesc. Este cunoscut însă că eficacitatea bacteriofagilor, asemenea multor altor agenți biologici, depinde de influența principalelor factori ai mediului înconjurător și particularitățile organismului infectat [20, 31]. Dar această problemă este studiată insuficient. Starea slabă de cercetare a bacteriofagilor și lipsa datelor despre rolul bacteriofagilor în profilaxia și reținerea răspândirii focului bacterian au condiționat alegerea actualei teme de cercetare.

**Scopul lucrării** constă în determinarea particularităților biologice ale patogenului *E. amylovora* și bacteriofagilor lui și stabilirea posibilităților de aplicare a bacteriofagilor *E. amylovora* în combaterea focului bacterian. Pentru realizarea scopului cercetărilor s-au trasat următoarele **obiective**:

- Izolarea, identificarea agenților patogeni și caracterizarea patogenității bacteriilor *E. amylovora* (Burrill) Winslow et al.
- Izolarea și identificarea bacteriofagilor bacteriei *E. amylovora* (Burrill) Winslow et al.
- Determinarea particularităților reproducerii bacteriofagilor *E. amylovora* în condiții controlate și naturale.
- Evaluarea eficacității biologice a bacteriofagilor *E. amylovora* în combaterea focului bacterian al rozaceelor la culturile pomicele în condiții naturale.

**Metodologia cercetării științifice.** Izolarea și identificarea bacteriei *E. amylovora* și a bacteriofagilor ei precum și determinarea eficacității biologice a bacteriofagilor *E. amylovora* în combaterea focului bacterian în condițiile de laborator și de câmp deschis au fost executate conform metodelor general acceptate [4, 6, 15, 16, 17, 18, 24, 26, 28, 29].

**Noutatea științifică a rezultatelor.** Au fost izolați, identificați și caracterizați bacteriofagii care lizează bacteriile patogene *E. amylovora*. Bacteriofagii izolați sunt reprezentanți ai familiilor *Myoviridae* și *Siphoviridae* și posedă capacitatea de infectare a bacteriilor independent de grosimea stratului exopolizaharidic al anvelopei celulare. A fost determinată dinamica sezonieră a populațiilor de bacteriofagi ai *E. amylovora* în condițiile naturale și controlate. A fost stabilită eficacitatea biologică a bacteriofagilor *E. amylovora* în inhibarea creșterii bacteriilor *E. amylovora*, și demonstrată eficiența biologică a bacteriofagilor izolați în reducerea gradului de infectare a puietilor pomicoli cu focul bacterian în condiții de câmp.

**Importanța teoretică a lucrării.** Rezultatele cercetărilor efectuate constituie un aport consistent la studiul bazelor teoretice privind interacțiunea bacteriilor patogene *E. amylovora* cu bacteriofagii lor în țesuturile plantelor gazde în condiții naturale și controlate.

**Problema științifică importantă soluționată** constă în *fundamentarea științifică* a capacităților bacteriofagilor *E. amylovora* izolați, identificați și caracterizați cu capacitatea de lizare celulelor agentului patogen, *ceea ce a condus la elaborarea* elementelor tehnologice de producere a biomasei active a bacteriofagilor identificați și reducerea gradului de infectare a puietilor pomicoli în condiții de laborator și câmp deschis.

**Valoarea aplicativă a lucrării.** Bacteriofagii joacă un rol important în reținerea dezvoltării focului bacterian la culturile pomicele. Procedeele metodologice elaborate în legătură cu izolarea, identificarea și aplicarea bacteriofagilor pot fi utilizate nemijlocit la studierea modelelor ”bacteria patogenă *E. amylovora* - bacteriofag”. Unele izolate extrase de bacteriofagi au demonstrat o activitate biologică înaltă în inhibarea dezvoltării focului bacterian, care constituia 89,0%. Acest fapt ne permite să considerăm bacteriofagii ca unul

din mijloacele de combatere a focului bacterian la culturile pomicole semînţoase. A fost propusă o metodă de obţinere a culturii de bacteriofagi în timpul creşterii bacteriei *E. amylovora* în bulionul Luria Bertrani la temperatura de +28<sup>0</sup>C. A fost determinată concentraţia optimă a fagolizatului pentru tratarea puieţilor contra focului bacterian al culturilor pomicole, care trebuie să constituie 10<sup>7</sup> - 10<sup>8</sup> PFU/ml.

#### **Rezultatele ştiinţifice principale înaintate spre susţinere:**

1. Culturile semînţoase în Republica Moldova sunt atacate de bacteriile patogene *E. amylovora*. Lipsa mijloacelor eficiente de protecţie ale culturilor pomicole contra focului bacterian a determinat necesitatea elaborării unor măsuri noi de combatere a acestei boli, cum ar fi utilizarea patogenilor obligaţi ai bacteriilor – bacteriofagii.

2. Izolatele extrase ale bacteriofagilor aparţin familiilor *Myoviridae* şi *Siphoviridae* şi reprezintă virusuri înregistrate cu coadă. Capacitatea fagilor din familia *Myoviridae* de a infecta celule bacteriene nu depinde de gradul de dezvoltare a stratului exopolizaharidic al bacteriei-gazdă.

3. În cazul lipsei metodelor cu eficienţa înaltă de combatere a bacteriozelor, bacteriofagii obţinuţi ca paraziţi intracelulari cu specificitate înaltă care reglează densitatea populaţiilor de bacterii fitopatogene pot servi drept una din mijloacele de protecţie contra focului bacterian la culturile pomicole.

**Implementarea rezultatelor ştiinţifice:** Bacteriofagii *E. amylovora* izolaţi au fost testaţi în combaterea focului bacterian în livada de măr din gospodăria agricolă ”AgroBrio”, comuna Bacioi, raionul Ialoveni. Rezultatele privind particularităţile bioecologice ale bacteriofagilor obţinuţi în cadrul cercetărilor au fost utilizate la pregătirea cursului de virusologie, pentru studenţii Universităţii de Stat a Moldovei.

**Aprobarea rezultatelor ştiinţifice.** Teza a fost elaborată în cadrul proiectului instituţional 06.407.022F “Elaborarea tehnologiilor de aplicare a preparatelor biologice în baza a baculovirusuri, bacterii sporifere, nematozi entomopatoşi, bacteriofagi şi cuperci antagoniste pentru utilizarea în agricultura “.

Materialele tezei au fost prezentate şi discutate la şedinţele laboratorului şi consiliului ştiinţific al institutului şi la foruri ştiinţifice naţionale şi internaţionale: «Синантропизация растений и животных» (Irkutsk, 2007), «Интегрированная защита растений – стратегия и тактика» (Minsk, 2011), «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем» (Krasnodar, 2012), «Protecţia plantelor – realizări şi perspective» (Chişinau, 2009), «Protecţia plantelor – probleme şi perspective» (Chişinau, 2012), «Pathogens and

antagonists: the multiple role of bacteria in biological plant protection", Kyrgyz-Uzbek-Kazakh-German multilateral programme for cooperation BIOPROTECT (Bishkek, Almaty, 2014); XVIII International Plant Protection Congress «Mission possible: food for all through appropriate plant protection» (Berlin, 2015); «Protecția plantelor – realizări și perspective», Chișinău, 2015, “Genetics for Biocontrol”, Geisenheim, Germania, 2015.

**Publicații la tema tezei.** La tema tezei au fost publicate 12 lucrări științifice, inclusiv 2 articole în reviste recenzate și 5 publicații fără coautori.

**Volumul și structura tezei.** Materialele disertației sunt expuse pe 109 pagini text de bază, include trecerea în revistă a literaturii, descrierea materialelor și metodelor, rezultatele cercetărilor, concluziile principale și recomandări. Lista bibliografică constă din 240 de surse. Lucrarea conține 8 tabele, 35 de figuri și două anexe.

**Cuvinte cheie:** bacteriofagi, *Erwinia amylovora*, focul bacterian, eficacitate biologică, fagoterapie, protecția biologică

## **CONȚINUTUL TEZEI 1. FAGOTERAPIA ÎN COMBATerea BACTERIOZELOR PLANTELOR**

Sunt expuse cunoștințele moderne despre agentul patogen al focului bacterian al culturilor pomicele provocat (*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.) și despre măsurile elaborate pentru combaterea acestei bacterioze periculoase [26, 31, 32]. În ciuda acumulării unui număr impresionant de date despre structura și particularitățile procesului de patogeneză, multe detalii deocamdată rămân neclare și se necesită cercetări amănunțite în continuare. Sunt aduse cunoștințe disponibile în prezent despre structura și proprietățile bacteriofagilor [4, 23, 33]. Este descrisă utilizarea bacteriofagilor în calitate de mijloc de combatere a bolilor bacteriene. Sunt prezentate opiniile cercetătorilor despre avantajele, neajunsurile și procedeele de depășire a problemelor legate de aplicarea fagoterapiei în combaterea bacteriozelor și, în particular, a focului bacterian al culturilor pomicele [7, 20, 30]. Analiza surselor bibliografice a demonstrat că pentru elaborarea măsurilor eficiente de combatere a patogenului este necesară studierea detaliată a proprietăților microorganismelor din ecosistemul concret [10]. În consecință, pentru o aplicare eficientă a fagoterapiei în combaterea focului bacterian al culturilor pomicele în Republica Moldova este necesară cercetarea izolatelor locale ale bacteriilor *E. amylovora* și a bacteriofagilor lor.

## 2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Cât izolarea atât și identificarea bacteriilor și bacteriofagilor s-au efectuat în Laboratorul de Fitopatologie și Biotehnologie al Institutului de Genetica, Fiziologie și Protecție a Plantelor al AȘM, Chișinău; Laboratorul de Protecție a Plantelor al Institutului Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare, Chișinău; Laboratorul de Microbiologie și Biotehnologie al Institutului de Protecție Biologică a Plantelor, Darmstadt (Germania).

În calitate de material de cercetare au servit bacteriile *E. amylovora* și bacteriofagii bacteriei *E. amylovora* izolate din pomii de gutui, măr, păr și păducel, precum și tulpina bacteriei *E. amylovora* Ea179 și tulpinile bacteriofagilor phiEa1h (*Podoviridae*) și phiEa104 (*Myoviridae*) izolate în America de Nord, prezentate cu amabilitate de către profesorul Claus Geider (JKI, Dossenheim, Germania).

Izolarea bacteriei *E. amylovora* s-a efectuat conform metodei general acceptate privind izolarea bacteriilor fitopatogene [6], precum și metodei lui Waite M. B. [32].

Proprietățile culturale ale bacteriilor au fost determinate prin metoda însemnării pe medii nutritive standard [6], precum și pe un mediu nutritiv de diagnosticare [15].

Patogenitatea bacteriilor *E. amylovora* a fost studiată după gradul de inducere a reacției hipersensibilității la plantele-gazde nespecifice (frunze juvenile de castraveți) și după virulența pe fructe necoapte de păr. Fiecare izolat de bacterii a fost încercat pe un număr mai mare de 5 plante. Necrozele apărute în urma reacției de răspuns a plantei la injectarea bacteriei *E. amylovora* s-au estimat înconformitate cu scara următoare: 0- lipsa necrozelor; 0,1 - 0,2 – necroze pe 5% din suprafața frunzei; 0,3 - 0,5 necroze pe 25% din suprafața frunzei; 0,6 - 0,8 necroze pe 75% din suprafața frunzei; 0,9 - 1,0 necroze pe 90% din suprafața frunzei [18].

Morfologia bacteriei *E. amylovora* și a bacteriofagilor acesteia a fost determinată cu ajutorul microscopiei electronice.

Izolarea și purificarea fagilor s-a efectuat prin metoda straturilor de geloză [4], precum și metoda modificată cu utilizarea procedeelelor descrise de către Adams M., 1961, Schnabel and Jones, 2001, Boulé et al, 2011[4, 16, 29]. Poziția sistematică a fagilor a fost determinată prin metoda PCR cu utilizarea marcatorelor *tls* [28].

Eficacitatea suprimării creșterii *E. amylovora* de către bacteriofagi a fost studiată pe fructe verzi de păr într-o cameră umedă; în condiții de laborator pe lăstari tăiați de portaltoi de gutui plantați în sol deschis care erau infectați prin injectarea suspensiei de bacteria *E. amylovora* în concentrație de  $3 \times 10^7$  CFU/ml. Ulterior, plantele au fost tratate cu fagolizate în concentrație de  $2 \times 10^9$  PFU/ml.

### 3. CARACTERISTICA BACTERIEI *ERWINIA AMYLOVORA* ȘI A BACTERIOFAGILOR EI

#### 3.1. Depistarea și identificarea bacteriei *Erwinia amylovora* – patogen al focului bacterian al culturilor pomicele

În livezile pomicele experimentale și industriale ale Republicii Moldova, precum și în plantațiile decorative de pe teritoriul municipiului Chișinău în anii 2000-2012 s-a efectuat colectarea mostrelor de plante din familia rozaceae cu simptome specific focului bacterian. Inițial, bacteriile *E. amylovora* au fost identificate după metoda lui Waite. Cercetările ulterioare s-au efectuat cu izolatele bacteriilor extrase din plantele de genul *Cydonia* Mill., *Malus* Mill., *Pyrus* L., *Crataegus* L. care au demonstrat un rezultat pozitiv la testarea cu metoda lui Waite.

Toate izolatele studiate de noi, la însemnare pe mediul de diagnosticare MM2Cu formau colonii de culoare galbenă. Pe mediul King B coloniile tuturor izolatelor de bacterii cercetate nu conțineau pigment fluorescent. Pe mediul nutritiv C3 coloniile bacteriilor erau de culoare alba-surie de tipul S, iar pe geloza nutritivă LB coloniile erau albe fără nuanță galbenă. Pe mediul Levan toate izolatele formau colonii de forma unei cupole de tipul S. Însă izolatele bacteriilor extrase în Republica Moldova, spre deosebire de tulpina germană Ea179, pe mediul nutritiv LB creșteau mai anevoios decât pe mediul nutritiv C3.

În urma studierii izolatelor bacteriene cu ajutorul microscopiei electronice s-a stabilit că bacteriile extrase noi din plantele-gazdă din familia rozaceae sunt baciliforme cu capetele rotunjite de dimensiunea 1,7-1,1 mcm cu amplasarea peritrichială a flagelilor.

Astfel, prin metoda lui Waite, metoda însămânțării pe medii nutritive standard și de diagnosticare, precum și cu ajutorul microscopiei electronice au fost izolate și identificate bacteriile virulente *E. amylovora* din pomii de gutui, măr, păr și păducel.

**Virulența și reacția hipersensibilității a izolatelor de *E. amylovora*.** Luând în considerare ca virulența bacteriilor *E. amylovora* corelează cu capacitatea lor de a provoca eliminarea exudatului alb-lactic pe fructele necoapte de păr și reacția hipersensibilității pe negazda nespecifică [24, 34], pentru a stabili izolatul din bacteriile *E. amylovora* cel mai virulent, a fost determinat gradul de virulență pe fructe verzi de păr și gradul de inducere a reacției de hipersensibilitate pe frunzele de castraveți care provocau izolatele de *E. amylovora*, extrase din subfamilia *Prunoideae*. Estimarea comparativă a virulenței și inducerii reacției de hipersensibilitate a demonstrat că izolatele bacteriei *E. amylovora* nu se deosebesc substanțial după virulență și capacitatea de a induce reacția de hipersensibilitate [11].



### 3.2. Evidențierea și identificarea bacteriofagilor bacteriei *Erwinia amylovora*

În perioada anilor 2001 și 2013 în partea centrală a Republicii Moldova au fost izolați bacteriofagi care lizează celulele bacteriilor patogene *E. amylovora*. Au fost evidențiate și selectate nouă mostre de bacteriofagi izolați din coroana plantelor din subfamilia *Prunoideae* și patru mostre izolate din sol în preajma tulpinilor pomilor vătămați. În timpul experiențelor a fost determinată concentrația bacteriofagilor izolați ai *E. amylovora* în țesuturile plantelor-gazdă și determinate dimensiunile coloniilor negative pe care particulele de fag le formau pe gazonul bacterian în urma însemnării pe geloza nutritivă a lui Luria Bertrani (Tabelul 3.1).

Tabelul 3.1. Particularitățile izolatelor bacteriofagi *E. amylovora* extrase din plantele din familia rozaceae de pe teritoriul mun. Chișinău

Nr Izolatului	Codul izolatului	Planta-gazdă	Sursa	Diametrul mediu al coloniilor negative, mm (geloza LB)	Concentrația, PFU/g
1	503φM2- a	<i>Malus domestica</i> Borkh.	coroana	1.0-1.5	10 <sup>2</sup>
2	503φP5- a	<i>Pyrus communis</i> L	coroana	1.0-1.5	2x10 <sup>2</sup>
3	503φP3- a	<i>Pyrus communis</i> L.	coroana	1.0-1.5	4,2x10 <sup>3</sup>
4	502φM7- a	<i>Malus domestica</i> Borkh.	coroana	1.0-1.5	2,5x10 <sup>3</sup>
5	612φCy2- s	<i>Cydonia oblonga</i> Mill.	sol	1.0-1.5	10 <sup>2</sup>
6	512φP2-s	<i>Pyrus communis</i> L.	coroana	1.0-1.5	10 <sup>2</sup>
7	511φCe1-a	<i>Cerasus tomentosa</i> (Thunb.) Wall	coroana	1.0-1.5	10 <sup>2</sup>
8	512φCr1 -s	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	sol	1.0-1.5	10 <sup>2</sup>
9	512φM1- s	<i>Malus domestica</i> Borkh.	sol	1.0-1.5	10 <sup>2</sup>
10	502φCr1-a	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	coroana	0.5-1.0	2,4x10 <sup>4</sup>
11	605φCy1- a	<i>Cydonia oblonga</i> Mill.	coroana	1.5-2	7x10 <sup>4</sup>
12	512φM5- a	<i>Malus domestica</i> Borkh.	coroana	1.0-1.5	10 <sup>2</sup>
13	612φM3- a	<i>Malus domestica</i> Borkh.	sol	1.0-1.5	10 <sup>2</sup>

Cea mai mare concentrație de bacteriofagi în condiții naturale a fost înregistrată în mostrele colectate din coroana gutuiului -  $7 \times 10^4$  PFU/g. Cei mai puțini bacteriofagi s-au găsit în țesuturile mărului -  $10^2$  PFU/g.

Particulele fagocite care au demonstrat cea mai înalt rezistență față de procesul de izolare și purificare au fost studiate cu ajutorul microscopie electronice (Figura 3.1).

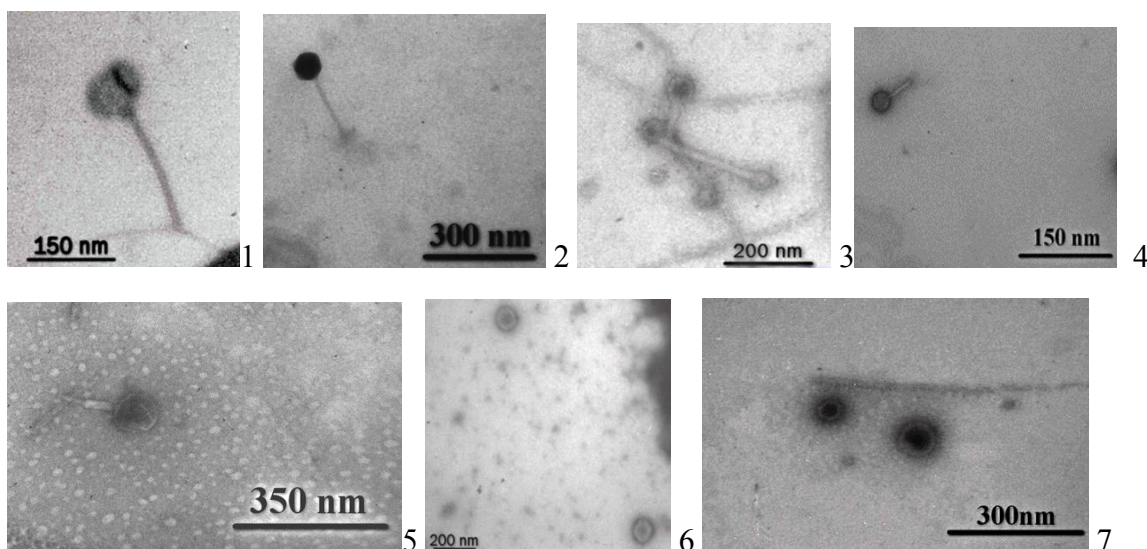


Fig. 3.1. Particularitățile morfologice ale particulelor fagilor 1,2,3 – *Siphoviridae*, 4, 5 – *Myoviridae*, 6, 7 – *Microviridae*.

În figura 3.1 sunt prezentate particulele fagice obținute în rezultatul studierii bacteriofagilor bacteriei *E. amylovora* cu ajutorul microscopiei electronice. Izolatele extrase conțineau particule fagice de trei tipuri morfologice:

- 1) particule cu coadă lungă necontractantă – reprezentanți ai familiei *Siphoviridae*;
- 2) particule cu coadă lungă contractantă – reprezentanți ai familiei *Myoviridae*;
- 3) fagi sferici, ipotetic reprezentanți ai familiei *Microviridae* [13, 14].

**Identificarea bacteriofagilor bacteriei *Erwinia amylovora* prin metoda PCR.** În baza arborelui filogenetic a fagilor întocmit de Born și al., 2011 [17], precum și cu utilizarea datelor despre genomurile fagilor disponibili în banca genetică, a fost efectuată compararea consecutivității nucleotidice a subunităților mari ale terminazelor bacteriofagilor din grupurile M7 și L1. În scopul amplificării consecutivităților *tls* a genelor din genomurile fagilor din grupurile M7 și L1 au fost selectate perechile degenerative ale praimerilor respectivi *tlsM7F100/R500* și *tlsL1F180/R550*.

Folosirea perechilor de praimerți *tlsL1F180/tlsL1R550* la lizatele fagice nu a înregistrat niciun semnal. În același timp, nouă lizate fagice au dat un produs PCR cu perechea praimerților *tlsM7F100/tlsM7R500* cu dimensiunea mai mare de 1,2 kb similar pentru virusurilor din grupul M7. Aceeași dimensiune a produsului PCR a arătat lizatul miovirusului *phiEa104* utilizat în calitate de control pozitiv (Figura 3.2).

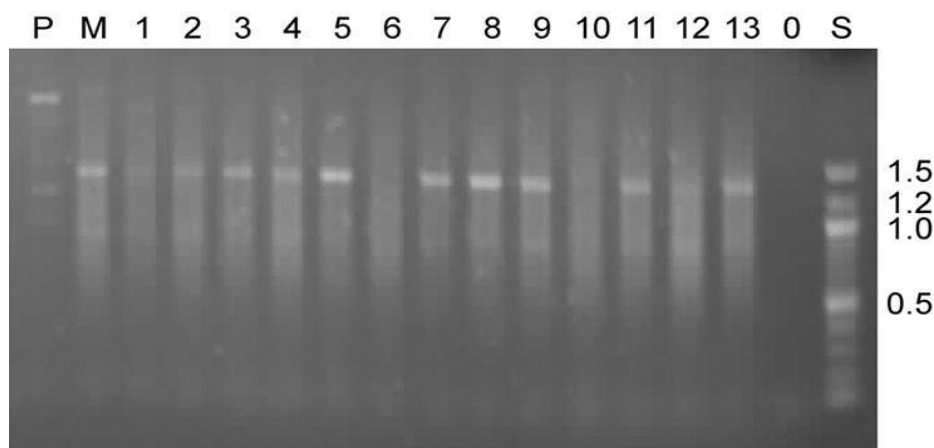


Fig. 3.2. PCR de diagnosticare cu utilizarea praimerților *tlsM7F100/tlsM7R500*.

Linia P: *phiEa1h* (*Podoviridae*); linia M: *phiEa104* (*Myoviridae*); liniile 1-13: izolate fagice, numerat în corespundere cu Tabelul 3.1. linia 0 : control negativ; linia S : DNA marcator 100 pn (NEB), dimensiunile produselor PCR (în kb) sunt indicate în dreapta.

Rezultatele obținute indică faptul că aplicarea metodei bazate pe utilizarea marcatorului *tls* la fagii izolați de noi, ne-a permis să identificăm virusurile din grupul M7 în patru din cele nouă mostre colectate în coroana plantelor infectate de către focul bacterian, și în toate cele cinci mostre izolate din sol. În același timp în mostrele cercetate nu a fost depistat nici un fag, reprezentând grupul L1 [27].

#### **4. POSIBILITATEA APLICĂRII BACTERIOFAGILOR BACTERIEI *ERWINIA AMYLOVORA* ÎN COMBATerea FOCULUI BACTERIAN AL CULTURILOR POMICOLE**

##### **4.1. Caracterizarea sistemului ”bacteriofagul bacteriei *Erwinia amylovora* - bacteria *Erwinia amylovora* – planta-gazdă”**

Pentru obținerea fagolizatului cu un titru înalt bacteriofagii trebuie să fie introduși în cultura de bacterii la faza lor exponențială. Noi am efectuat experiențe privitor la stabilirea timpului de apariție a fazei exponențiale de creștere a bacteriilor *E. amylovora*, fapt pentru care a fost determinată dinamica creșterii bacteriilor *E. amylovora*. Dinamica reproducerii

bacteriilor *E. amylovora* în cultură lichidă (LB bulion) a fost studiată prin metoda inoculării pe mediu nutritiv solid (geloza LB, mediu nutritiv C3). Cutiile cu mediul nutritiv au fost incubate în termostat timp de 24 ore la temperatura + 28°C (Figura 4.1).

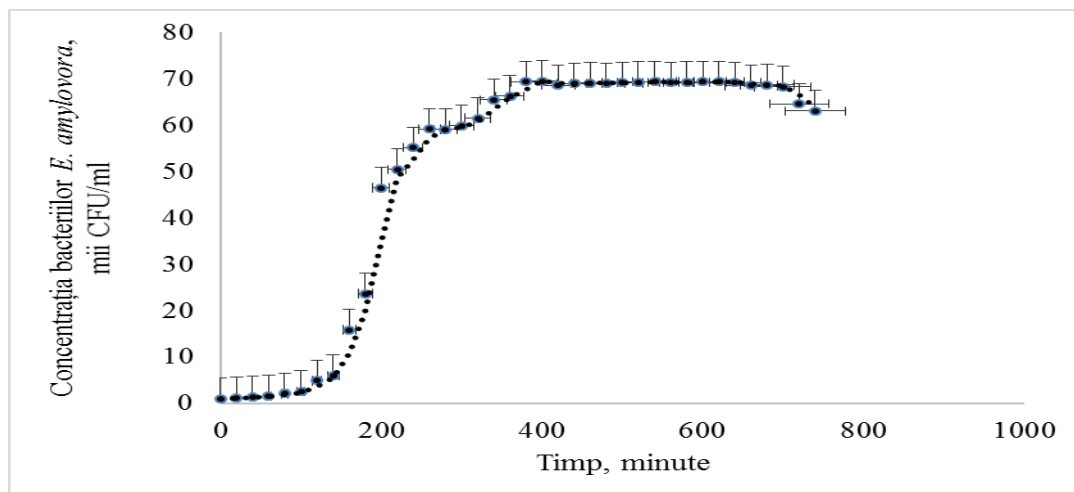


Fig. 4.1. Dinamica reproducerii bacteriilor *E. amylovora* în cultură lichidă.

Experiențele efectuate ne-au permis să stabilim că la cultivarea bacteriilor *E. amylovora* în bulionul LB la temperatura + 28°C faza-lag continuă până la 100 minute, faza creșterii exponențiale începe după una oră și 40 minute după inoculare și continuă una ora 40 de minute, apoi creșterea cantității de bacterii încetinează pe parcursul a trei ore, după care 4 ore și 40 minute se prelungește faza staționară de creștere a bacteriilor. După 10 ore și 40 de minute creșterea numărului de bacterii încetinează, iar peste 27 de ore cantitatea bacteriilor în cultura lichidă se micșorează semnificativ, ceea ce semnalizează despre stoparea creșterii și declinul populației bacteriene. În consecință, pentru obținerea fagolizatului cu un titru înalt în condițiile date de cultivare trebuie să introducem bacteriofagi după trei ore de la începutul creșterii bacteriilor.

Pentru determinarea cantității minime de bacteriofagi necesară pentru înfaptuirea lizarea bacteriilor în cazul cultivării în bulionul LB la temperatura de + 28°C, fagolizatului (izolatul 605φCy1-a) era adăugat în cultura bacteriilor *E. amylovora* din momentul începerii creșterii bacteriilor în mediul nutritiv lichid până la intrarea bacteriilor în faza staționară de creștere. Titrul bacteriilor și bacteriofagilor a fost ales astfel ca la o celulă bacteriană să revină circa șapte particule fagice (Figura 4.2).

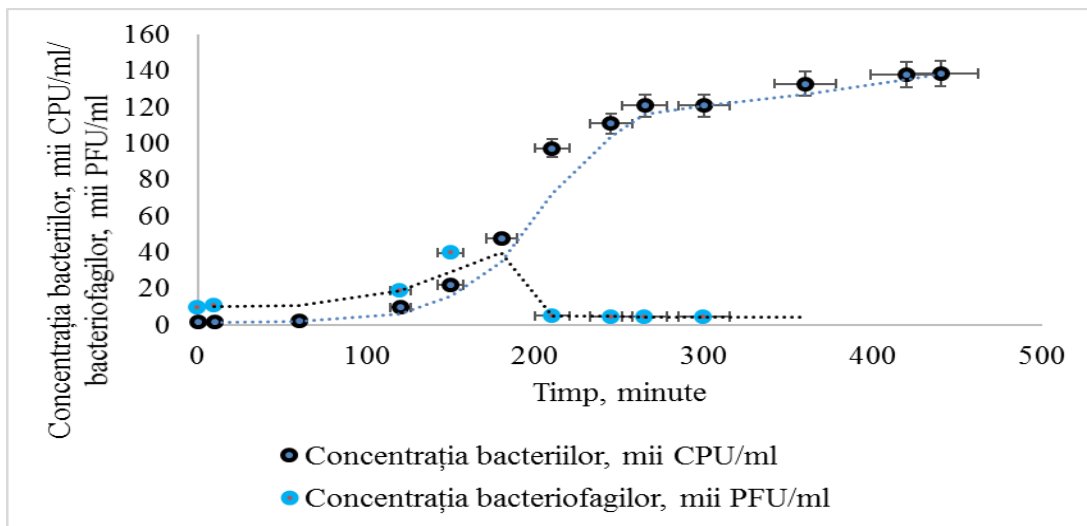


Fig. 4.2. Lizarea bacteriilor *E. amylovora* de către bacteriofagi la diferite concentrații de bacterii.

Experiența efectuată demonstrează, că în cazul metodei utilizate de cultivare pentru prepararea fagolizatului, care poate fi folosit contra patogenului focului bacterian al culturilor pomicele, este necesară introducerea bacteriofagilor în cultura de bacterii nu mai târziu decât după trei ore din momentul inoculării bacteriilor în mediul nutritiv. În acelaș timp s-a stabilit că fagii sunt capabili să lizeze bacteriile chiar dacă la 1 particulă de fag revin 25 de celule bacteriene, deși le sunt necesare pentru aceasta mai mult timp decât în cazul concentrațiilor mai mari de particule fagice.

În scopul studierii particularităților de dezvoltare ale fagilor în coroana culturilor pomicele în anul 2007 a fost efectuată analiza comparativă a dinamicii sezoniere a concentrației bacteriofagilor *E. amylovora* în țesuturile plantei-gazdă. În același timp din coroana de măr a soiului timpuriu ”Slava pobediteliam”, a soiului de toamnă ”Jonathan” și din pomul de păr în fiecare lună pe parcursul perioadei de vegetație se prelevau probe pentru testarea la prezența bacteriofagilor *E. amylovora*. Pentru testare se prelevau mugurii desfăcuți (mijlocul lunii aprilie), buchete florale (luna mai) și lăstari cu frunze în perioada din iunie până în octombrie. Fagii au fost determinați după morfologia coloniilor, viteza de formare a coloniilor pe gazonul bacterian și cu ajutorul microscopului electronic. A fost folosită cultura de acumulare a bacteriilor *E. amylovora* cu titrul  $3 \times 10^7$  CFU/ml. În figura 4.3 sunt prezentate rezultatele determinării concentrației de bacteriofagi în țesuturile pomilor fructiferi în condiții naturale (fig. 4.3 a), precum și datele despre temperatura medie lunară și cantitatea medie de precipitații pe parcursul sezonului vegetativ (fig. 4.3 b).

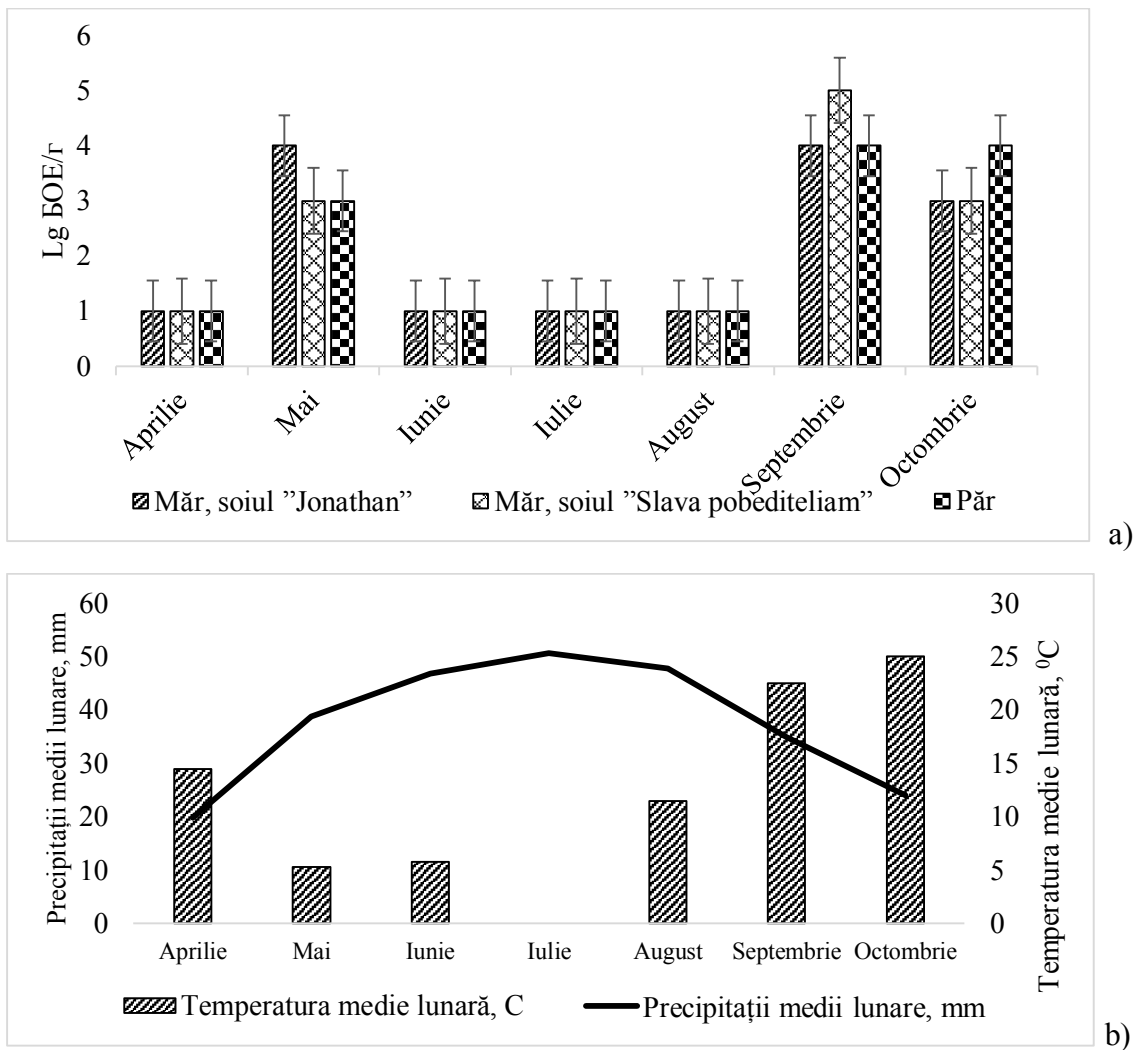


Fig. 4.3. Concentrația fagilor (503φM2-a; 503φP5-a) pe parcursul perioadei de vegetație în coroana pomilor de măr, soiul "Jonatan", "Slava pobediteliam", păr, IPPAE, anul 2007 (a); temperatura medie lunară și cantitatea medie de precipitații pe parcursul efectuării experienței în anul 2007 -<http://www.meteo.md> (vizitat 29.04.15) (b).

Rezultatele experienței au demonstrat că în condițiile naturale concentrația bacteriofagilor în țesuturile plantă gazdă variază în dependență de condițiile mediului înconjurător. S-a determinat că soiul de plante nu are nici un efect asupra concentrației de bacteriofagi în țesuturile plantei gazdă.

**Dinamica sezonieră a concentrației bacteriofagilor în țesuturile plantelor gazdă în condiții naturale și artificiale.** Variația sezonieră a concentrației bacteriofagilor a fost studiată în țesuturile plantei gazdă în condiții naturale și artificiale. În primul caz s-a evaluat cantitatea bacteriofagilor 502φCr1-a în țesuturile plantei de păducel afectat cu patogen și

crescut în condiții naturale. În al doilea caz, din planta de păducel – plantă-gază naturală atacată de focul bacterian, în prealabil au fost extrași fagii 502φCr1-a, cu care în toamna anului 2008 în laborator au fost tratate plantele experimentale (portaltoi de gutui), infectate cu patogen. Determinarea concentrației bacteriofagilor în țesuturile de plante în condițiilor de laborator și natură a fost efectuată din luna ianuarie până în octombrie a anului 2009.

În figura 4.4. sunt prezentate datele despre cantitatea bacteriofagilor 502φCr1-a în țesuturi de gutui în urma infectării artificiale și în țesuturile de păducel crescut în condiții naturale (fig. 4.4 a) în dependența de temperatura medie lunară și cantitatea medie de precipitații (fig. 4.4 b).

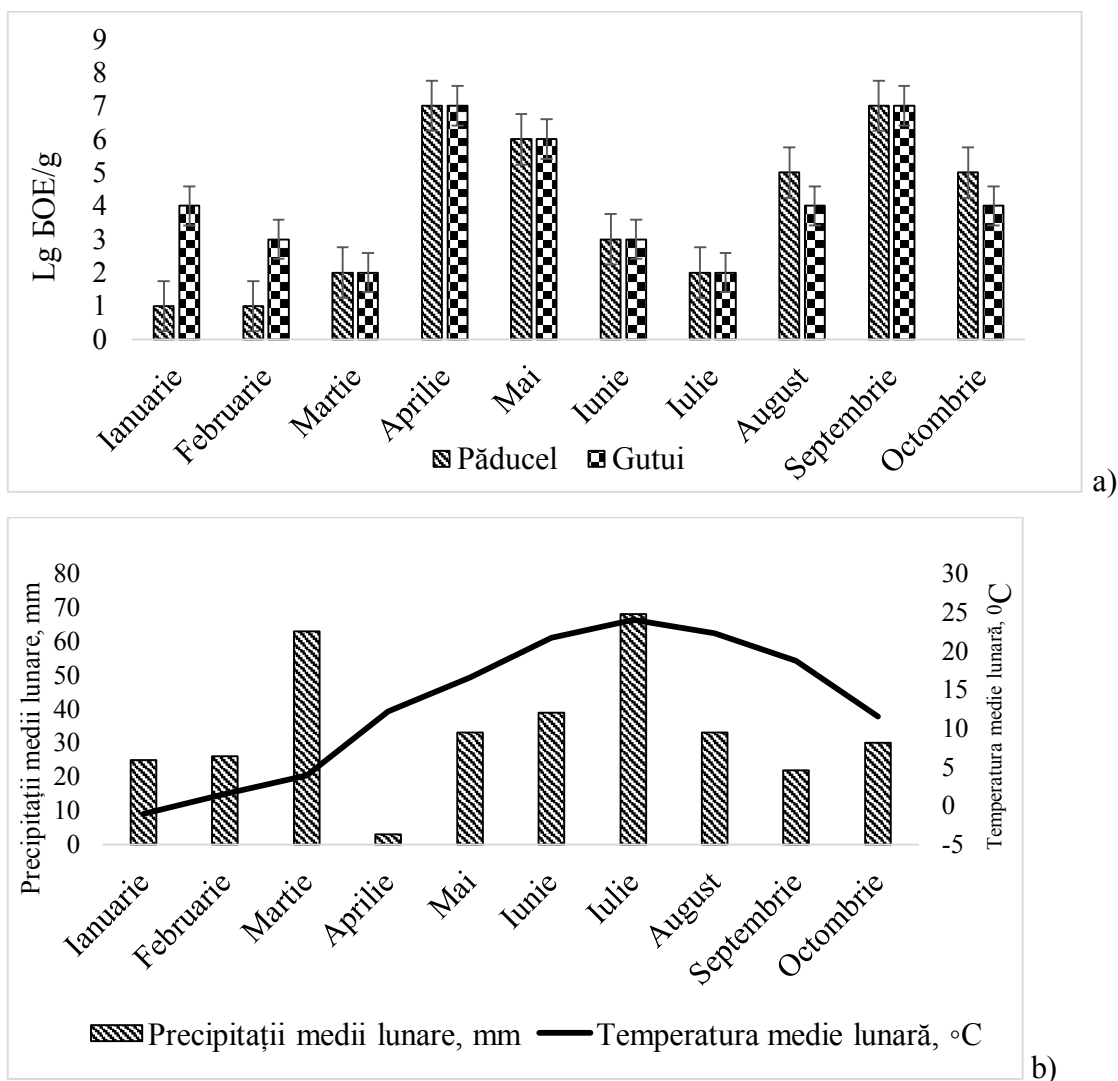


Fig. 4.4. Cantitatea izolatului 502φCr1-a de bacteriofagi în țesuturi de gutui (infectare artificială) și păducel (condiții naturale), anul 2009 (a); condiții climatice în perioada observărilor din anul 2009 [4] (b).

Astfel, s-a stabilit, că în condițiile naturale concentrația bacteriofagilor variază în dependență de condițiile mediului înconjurător și starea fiziologică a plantei-gazdă.

#### 4.2. Aplicarea bacteriofagilor bacteriei *E. amylovora* în combaterea focului bacterian al culturilor pomicole

În scopul stabilirii acțiunii bacteriofagilor asupra dezvoltării patogenului în țesuturile plantelor-gazdă s-a efectuat experiența cu tratarea lăstarilor plantelor experimentale cu bacteriofagi în condiții controlate. În același timp intensitatea dezvoltării focului bacterian în varianta, în care lăstarii portaltoiului de gutui erau infectați cu *E. amylovora* s-a deosebit esențial de intensitatea dezvoltării bolii în variantele unde lăstarii erau infectați cu izolatul patogenului *E. amylovora*, iar apoi erau tratați cu fagolizatele 605φCy1- a și 502φCr1-a (Figura 4.5).

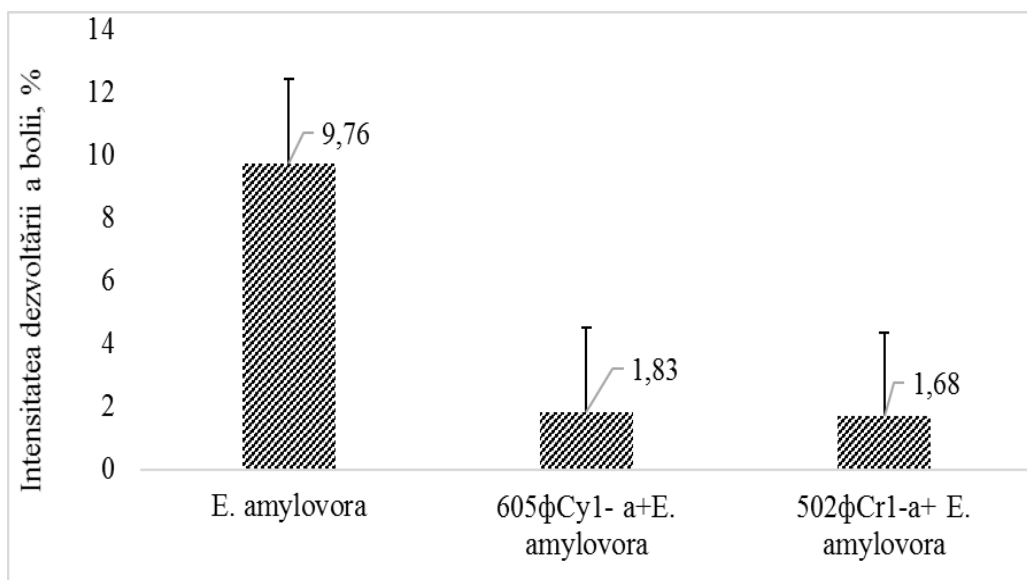


Fig. 4.5. Influența bacteriofagilor asupra intensității dezvoltării focului bacterian la temperatura de +28°C în condiții de umiditate sporită.

Datele prezentate în figura 4.5 indică, că intensitatea dezvoltării focului bacterian pe plantele infectate cu bacteriile *E. amylovora* și tratate cu fagolizate a fost esențial mai mică decât la plantele infectate cu patogenul focului bacterian dar netratate cu fagi.

Astfel, experiențele efectuate au demonstrate, că în condițiile favorabile pentru dezvoltarea patogenului în cazul tratării lăstarilor infectați de patogen cu fagi, simptomele caracteristice ale bolii lipsesc. În același timp, lăstarii netratați cu fagi manifestă simptome de boală clare.



**Eficacitatea biologică a bacteriofagilor în combaterea focului bacterian pe portaltoiul de gutui.** Bacteriofagii, care au demonstrat o eficacitate înaltă în stoparea creșterii bacteriilor patogene *E. amylovora* în laborator, au fost testate în calitate de agenți pentru combaterea biologică a focului bacterian al culturilor pomicele. Din cauza condițiilor nefavorabile pentru manifestarea simptomelor patogenului în perioada efectuării experiențelor, în calitate de criteriu al eficacității biologice a bacteriofagilor a fost utilizat un semn indirect – creșterea medie anuală a lăstarilor. Experiența a fost efectuată în patru variante: 1) tratarea plantelor cu apă (control); 2) infectarea plantelor cu bacterii patogene *E. amylovora* cu tratare ulterioară cu fagolizate; 3) infectarea plantelor cu bacterii patogene *E. amylovora*; 4) infectarea plantelor cu bacterii patogene *E. amylovora* cu tratare ulterioară cu bactericidul cupru "Cupromax". Evidența simptomelor de dăunare și determinarea lungimii lăstarilor s-a efectuat la începutul și sfârșitul sezonului vegetativ (Figura 4.6).

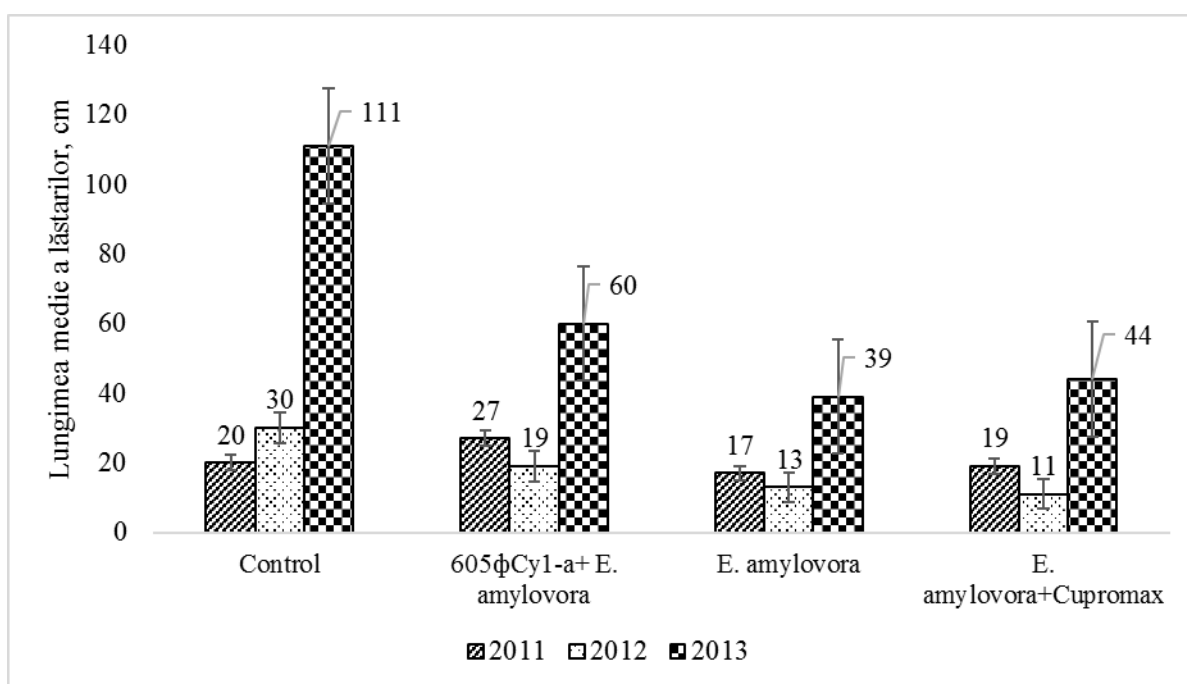


Fig. 4.6. Influența tratărilor asupra creșterii medii anuale a lăstarilor în urma controlului focului bacterian la puietii de gutui pe parcursul perioadei vegetative a) anul 2011; b) anul 2012; c) anul 2013.

Examinarea plantelor, efectuată în anul 2015 a demonstrat că pomii stropiți cu apă au înflorit abundent. Plantele infectate cu bacteriile *E. amylovora* și tratate cu fagolizat au înflorit mai slab. Pe plantele infectate cu bacteriile *E. amylovora* s-au înregistrat doar pe flori

unice. Plantele infectate cu bacteriile *E. amylovora* și tratate cu preparatul ”Cupromax” nu au înflorit deloc. La sfârșitul sezonului vegetativ fructele s-au format doar în variantele unde plantele au fost tratate cu apă distilată și fagolizat (Tabelul 4.1.).

Tabelul 4.1. Dezvoltarea plantelor pe sectorul experimental în al șaselea an de la montarea experienței, anul 2015

Indicator	Variante			
	Control (apă distilată)	Fagi+ bacteriile <i>E. amylovora</i>	Bacteriile <i>E. amylovora</i>	Bacteriile <i>E. amylovora</i> + Cupromax
Înflorire (evidența mai 2015)	+	+	-	-
Formarea fructelor (evidența 21.09.15)	+	+	-	-
Eficacitatea biologică		89%		25%
Intensitatea bolii, gradații	0,25	0,07	0,83	0,64
Răspândirea bolii, %	25%	7,14%	67%	67%

În al șaselea an de la efectuarea cercetărilor privitor la influența bacteriofagilor asupra dezvoltării bacteriilor în țesuturile portaltoilor de gutui, plantele infectate cu bacteriile patogene *E. amylovora* și tratate cu bacteriofagi, s-au dezvoltat mai bine decât plantele din varianta unde se efectua infectarea plantelor cu bacteriile patogene *E. amylovora* și varianta în care plantele infectate cu *E. amylovora* au fost tratate cu preparatul ”Cupromax”. Pe plantele tratate cu fagolizat s-a observat o înflorire activă și formarea fructelor la sfârșitul sezonului vegetativ.

Eficacitatea biologică a bacteriofagilor care era calculată după formula modificată a lui Abbot, la sfârșitul sezonului vegetativ a constituit 89,0%.

Rezultatele experienței în câmp care au fost îndeplinite din anul 2009 până în anul 2015 pe portaltoi de gutui plantat în sol deschis au demonstrat, că bacteriofagii rețin dezvoltarea populației de bacterii *E. amylovora* la un nivel, care nu manifestă acțiune inhibitoare asupra plantelor. Fiecare comunitate de fagi și bacterii se află sub acțiunea

factorilor abiotici, caracteristici doar pentru locul concret și determină caracterul și dezvoltarea corelațiilor în sistemul dat. De aceea efectul selecției bacteriilor inițiate de fagi este imprevizibil și depinde de comunitatea naturală de fagi și bacterii care îi înconjoară [22]. În consecință, aplicarea fagoterapiei trebuie să fie elaborată cu luarea în evidență a particularităților unui sistem aparte ”planta-gazdă – bacterie - bacteriofag”. Doar în acest caz devine posibilă folosirea cu succes a particularității principale ale bacteriofagilor – parazitarea doar pe bacterii și capacitatea de a-și modifica structura și proprietățile împreună cu schimbarea gazdei bacteriene în condițiile concrete ale mediului înconjurător.

## CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI PRACTICE

### Concluzii generale

1. Au fost separate și caracterizate bacteriile patogene *Erwinia amylovora* care infectează plantele pomicele și decorative din familia rozaceae, identificarea cărora a fost efectuată în baza particularităților de manifestare a simptomelor pe plantele-gazdă, precum și după un complex de proprietăți cultural-morfologice.

2. Bacteriile separate din diverse plante gazdă nu se deosebesc esențial după virulență și capacitatea de inducere a reacției de hipersensibilitate. Gradul de virulență și gradul de inducere a reacției de hipersensibilitate au constituit de la 0,4 până la 0,8 gradații, și respectiv de la 0,5 până la 0,9 gradații.

3. Din coroana și solul din preajma plantelor atacate de către focul bacterian au fost izolate și descrise 13 izolate de bacteriofagi capabili să lizeze celulele bacteriilor patogene *Erwinia amylovora*. Cea mai mare concentrație de bacteriofagi a fost înregistrată în mostrele prelevate din coroana pomului de gutui, atingând  $7 \times 10^4$  PFU/g și cei mai puțini sau depistat în țesuturile mărului –  $10^2$  PFU/g.

4. Conform datelor microscopiei electronice și metodei PCR cu utilizarea markerilor *tls*, în patru izolate de fagi extrași din coroana pomilor au fost identificate virusurile din grupul M7 (*Myoviridae* și *Siphoviridae*). În toate mostrele cercetate nu au fost depistați bacteriofagi reprezentanți ai grupului L1 (*Podoviridae*).

5. S-a stabilit că titrul maximal de bacteriofagi se înregistrează la faza de creștere exponențială a bacteriilor *Erwinia amylovora* în cultura lichidă (bulion LB) cu o durată de 1 oră și 40 minute și cu o cantitate minimală de bacteriofagi necesari lizării bacteriilor la temperatura de  $+28^{\circ}\text{C}$ . Fagii sunt capabili de a liza bacteriile când există 1 particulea: 25 celule bacteriene.

6. S-a demonstrat că în perioada cu temperaturi înalte și umiditate joasă concentrația fagilor în țesuturile plantelor este minimală. În cazul condițiilor favorabile pentru dezvoltarea bacteriei - gazdă concentrația bacteriofagilor atinge cantitatea de  $10^4$  PFU/g.

7. Eficacitatea biologică a bacteriofagilor 605φCy-a în condiții naturale pe portaltoaiul de gutui a constituit 89,0%.

### **Recomandări practice**

1. Bacteriofagii 605φCy1-a pot fi folosiți în calitate de mijloc eficient de combatere a focului bacterian al rozaceelor, deoarece ei pot reține dezvoltarea populațiilor de bacterii fitopatogene *E.amylovora* la un nivel care nu provoacă tulburări grave în dezvoltarea culturilor pomicole.

2. Pentru protecția culturilor pomicole de atacul focului bacterian al rozaceelor se propune utilizarea bacteriofagilor 605φCy1-a cu titrul de  $10^8$ - $10^9$  PFU/ml.

3. Pentru prepararea fagolizatului pe mediul de cultură Luria-Bertani la temperatura de  $+28^{\circ}\text{C}$  se propune inocularea bacteriofagilor în cultura bacteriei gazdă *E. amylovora* după 3 ore de la începutul cultivării ei.

4. Pentru protecția culturilor pomicole de atacul focului bacterian al rozaceelor se recomandă efectuarea tratamentelor cu suspensii bacteriofagice în perioada înfloririi plantelor gazdă și perioada creșterii secundare a lăstarilor, decada a treia a lunii august.

### **BIBLIOGRAFIE**

1. Registrul de stat al produselor de uz fitisanitar și al fertilizanților, permise pentru utilizare în Republica Moldova, Chișinău, 2012. 312 p.

2. Spoială L. ș.a. Resursele naturale și mediul în Republica Moldova. Culegere statistică Chișinău 2011, 105 p.

3. Zemic E., Luchîța V. Diagnosticul serologic al bacteriei *Erwinia amylovora*, patogenului focului bacterian al pomilor fructiferi prin tehnica DAS ELISA. În: Protecția plantelor, Societatea Națională de protecție a plantelor. Romania, 1997, p. 162-164.

4. Адамс М. Бактериофаги. М.: Издательство иностранной литературы, 1961. 527 с.

5. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.

6. Кирай З., Клемент З., Вереш И. Методы фитопатологии. М.: Колос, 1974. 343 с.

7. Крылов В. Н. Фаготерапия с точки зрения генетики бактериофага: надежды, перспективы, проблемы безопасности, ограничения. В: Генетика, 2001, т. 37, N 7, с. 869-887.

8. Николаев А.Н., Волощук Л. Ф., Тертяк Д.Д. Бактериальный ожог плодовых культур – новое для Молдовы заболевание. В: Интегрированная защита растений (сборник трудов) Institutul de protecție biologică a plantelor, Chișinău, 1997, с.194-198.
9. Попов С.Я. Дорожкина Л.А., Калинин В.А. Основы химической защиты растений. Москва: Арт-Лион, 2003. 208 с.
10. **Самойлова А.** Бактериофаги: проблемы и перспективы использования в борьбе с бактериальными заболеваниями. În: Mediul Ambient. 2014, nr.1 (73), p. 27-31.
11. **Самойлова А.В.** Некоторые свойства изолятов бактерий *Erwinia amylovora*, выделенных из растений подсемейства *Prunoideae* Международный симпозиум «Защита растений – достижения и перспективы», (Кишинев), 2015, с. 273-276.
12. **Самойлова А. В.,** Мындра, В. Г., Тертяк, Д. Д. Выделение бактериофагов *Erwinia amylovora* из надземных частей растений семейства *Rosaceae*. В: Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем: междунар. науч.-практ. конф. Краснодар, 2004, с. 102.
13. **Самойлова А. В.,** Тертяк Д. Д. Бактериофаги *Erwinia amylovora* выделенные из *Cerasus tomentosa* (Thunb.) Wall. В: Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем: 7-я междунар. науч.-практ. конф., Краснодар 25-27 сент. 2012 г. Краснодар, 2012, с. 207-210.
14. **Самойлова А. В.,** Тертяк Д. Д. Бактериофаги *Erwinia amylovora* перспективные для сдерживания развития бактериального ожога плодовых. В: Защита растений: проблемы и перспективы: междунар. науч. симп., Кишинэу, 30-31 окт. 2012 г. Кишинэу, 2012, с. 242-245.
15. Bereswill St. et al. Identification of *Erwinia amylovora* by growth morphology on agar containing copper sulfate and by capsule staining with lectin. In: Plant Disease, 1998, vol.82, nr 2, p.158-164.
16. Boul'e J. et al. Isolation and characterization of eight bacteriophages infecting *Erwinia amylovora* and their potential as biological control agents in British Columbia, Canada. In: Canadian Journal of Plant Pathology, 2011, vol. 33, nr. 3, p. 308–317.
17. Born Y. et al. Novel virulent and broad-host-range *Erwinia amylovora* bacteriophages reveal a high degree of mosaicism and a relationship to Enterobacteriaceae phages. In: Applied Environmental Microbiology, 2011, vol. 77, p.5945-5954.
18. Cabrefiga J., Montesinos E. Analysis of aggressiveness of *Erwinia amylovora* using disease-dose and time relationships. In: Phytopathology, 2005, vol.95, p.1430–1437.

19. Constantinescu F. et al. Status of fire blight (*Erwinia amylovora*) disease in Romania: distribution, pathogen characterization and disease control. In: Acta Hort. (ISHS), 2011, vol. 896, p.505-510.
- 20 Jones J. B. et al. Bacteriophages for plant disease control. In: Annual Review of Phytopathology, 2007, nr. 45, p. 245-262.
21. Khan M.A., Zhao Y.F., Korban S.S. Molecular mechanisms of pathogenesis and resistance to the bacterial pathogen *Erwinia amylovora*, causal agent of fire blight disease in Rosaceae. Plant Mol Biol Rep, 2012, nr. 30, p. 247–260.
22. Koskella B., Brockhurst M.A. Bacteria–phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. In: FEMS Microbiology Reviews, 2014, vol.38, nr. 5, p. 916-931.
23. Krupovic M. et al. Genomics of bacterial and archaeal viruses: dynamics within the prokaryotic virosphere. In: Microbiology and Molecular Biology Review, 2011, vol.75, nr.4. p. 610–635.
24. Lee S. A. et al. Virulence characteristics accounting for fire blight disease severity in apple trees and seedlings. In: Phytopathology, 2010, vol.100, nr. 6, 539-550.
25. Patent Application WO/2014/177996 Mazzucchi U., Lucchese C., Mazzucchi A. Composition and method for preventing infections of vegetable tissues caused by *Erwinia amylovora* WIPO Publication Date: Nov. 6 2014  
<http://www.freepatentsonline.com/WO2014177996A1.html>. (visited 20.11.2014)
26. PM 7/20 (2)\* *Erwinia amylovora*, 2013. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2013, vol. 43, nr. 1, p.21-45.
27. **Samoilova A.V.**, Leclercq A. Genetic diagnosis of L1 and M7 group bacteriophages isolated from *Erwinia amylovora*. In: 18th International Plant Protection Congress Mission possible: food for all through appropriate plant protection, 24-27 Aug. 2015: abstr. Berlin, 2015, p. 356-357.
28. Serwer, P., et al. Improved isolation of undersampled bacteriophages: finding of distant terminase genes. In: Virology, 2004, nr. 329, p. 412–424.
29. Schnabel E. L. Jones A. L. Isolation and characterization of five *Erwinia amylovora* bacteriophages and assessment of phage resistance in strains. In: Applied and Environmental Microbiology, 2001, vol. 67, nr. 1, p. 59-64.
30. Schwarczinger I. et al. Control of fire blight by bacteriophages on apple flowers. In: Acta Horticulturae (ISHS) 2011, vol. 896, p.457-462.
31. Smith T. J. Fire blight: barriers to control in the past and present; future control strategies. In: 13th ISHS International Fire Blight Workshop abstract book, 2013, p.17-18.

32. Van der Zvet T., Beer S.V. Fire blight – its nature, prevention and control. A practical guide to integrated disease management. US Department of Agriculture, Agricultural Informational bulletin, 1991, nr. 631, 83 p.

33. Weitz J.S., Wilhelm S.W. Ocean viruses and their effects on microbial communities and biogeochemical cycles. In: F1000 Biology Reports, 2012, vol. 4, nr. 17, p. 8.

34. Zhao Y, Blumer SE, Sundin GW. Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue. In: Journal of Bacteriology, 2005, vol. 187, nr. 23, p. 8088-8103.

## **LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE LA TEMA TEZEI**

### **Articole în diferite reviste științifice**

#### **În reviste din străinătate recunoscute**

1. Samoilova A. V. and Leclerque A. PCR-based identification of *Erwinia amylovora* bacteriophages isolated in the Republic of Moldova. In: Journal of Virology and Microbiology, 2014, p. 1-7. ISSN 2326-7011

#### **În reviste din Registrul Național al revistelor de profil**

2. Самойлова А. Бактериофаги: проблемы и перспективы использования в борьбе с бактериальными заболеваниями. В: Mediul ambiant, 2014, nr. 1, с. 27-31. ISSN 1810-9551. (Cat. C).

### **Articole în culegeri științifice**

#### **Culegeri internaționale**

3. Самойлова А. О сдерживании распространения бактериального ожога плодовых. В: Синантропизация растений и животных: материалы Всерос. конф. с междунар. Участием. Иркутск, 2007, с. 243-245.

4. Самойлова А. В., Волощук Л. Ф. Возможность использования бактериофагов *Erwinia amylovora* в сдерживании развития бактериального ожога плодовых. В: Интегрированная защита растений: стратегия и тактика: материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию со дня организации РУП «Институт защиты растений». Несвиж, 2011, с. 343-346.

5. Самойлова А. В., Тертяк Д. Д. Бактериофаги *Erwinia amylovora* выделенные из *Cerasus Tomentosa* (Thunb.) Wall. В: Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем: 7-я междунар. науч.-практ. конф., Краснодар 25-27 сент. 2012 г. Краснодар, 2012, с. 207-210.

### **Culegeri de lucrări ale conferințelor Internaționale**

6. Самойлова А. В., Тертяк Д. Д. Бактериофаги *Erwinia amylovora* перспективные для сдерживания развития бактериального ожога плодовых. В: Защита растений: проблемы и перспективы: междунар. науч. симп., Кишинэу, 30-31 окт. 2012 г. Кишинэу, 2012, с. 242-245.

7. Самойлова А. В. Некоторые свойства изолятов бактерий *Erwinia amylovora*, выделенных из растений подсемейства *Prunoideae*. В: *Защита растений – результаты и перспективы: материалы докл. междунар. симп., 27-28 окт., 2015 г.* Кишинёв, 2015, с. 273-276. (Информ. бюл. ВПРС МОББ; 47).

### **Materiale/ teze la forurile științifice**

#### **Conferințe internaționale (peste hotare)**

8. Самойлова А. В., Мындра В. Г., Тертяк Д. Д. Выделение бактериофагов *Erwinia amylovora* из надземных частей растений семейства *Rosaceae*. В: Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем: междунар. науч.-практ. конф. Краснодар, 2004, с. 102.

9. Samoilova A. V., Leclercque A. Genetic diagnosis of L1 and M7 group bacteriophages isolated from *Erwinia amylovora*. In: 18<sup>th</sup> International Plant Protection Congress Mission possible: food for all through appropriate plant protection, 24-27 Aug. 2015: abstr. Berlin, 2015, p. 356-357.

#### **Conferințe internaționale în republică**

10. Самойлова А. В. Влияние бактериофагов *Erwinia amylovora* на развитие саженцев яблони, зараженных бактериальным ожогом. В: Защита растений – достижения и перспективы: материалы докл. междунар. симп., Кишинев, 19-22 окт. 2009 г. Кишинев, 2009, с. 364-365.

11. Самойлова А. Оценка вероятности возникновения эпифитотии бактериального ожога в лесах центральной части Молдовы. В: Rezervația «Codrii»: materialele simp. șt. intern.: Rezervația «Codrii» 40 ani. Chișinău, 2011, p. 334-336.

12. Самойлова А. В., Волощук, Л. Ф. Использование бактериофагов *Erwinia amylovora* в сдерживании развития бактериального ожога плодовых. В: *Biotehnologia microbiologică – domeniu scientintensiv al științei contemporane: conf. șt. intern., Chișinău, Moldova, 6-8 iul. 2011, Chișinău, 2011, p. 208.*



## ADNOTARE

**Anna Samoilova** "Aplicarea bacteriofagilor *Erwinia amylovora* în combaterea focului bacterian al culturilor pomicele", teza de doctor în științe biologice. Chișinău, 2016,

Teza constă din introducere, patru capitole, concluzii și recomandări practice. Bibliografia conține 240 de surse. Lucrarea este expusă pe 109 pagini de text de bază, conține 9 tabele, 35 figuri și 2 anexe. Rezultatele obținute sunt publicate în 12 de lucrări științifice.

**Cuvinte cheie:** bacteriofagi, *Erwinia amylovora*, focul bacterian, eficacitate biologică, fagoterapie, protecție biologică

**Domeniu de studiu:** protecția plantelor.

**Scopul lucrării:** determinarea particularităților biologice ale patogenului *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. și bacteriofagilor *Erwinia amylovora* și studierea posibilității de aplicare a bacteriofagilor *Erwinia amylovora* în combaterea focului bacterian.

**Obiectivele:** izolarea, identificarea agenților patogeni și caracterizarea patogenității bacteriilor *E. amylovora* (Burrill) Winslow et al; izolarea și identificarea bacteriofagilor bacteriei *E. amylovora*; determinarea particularităților reproducerii bacteriofagilor *E. amylovora* în condiții controlate și naturale; evaluarea eficacității biologice a bacteriofagilor *E. amylovora* în combaterea focului bacterian al rozaceelor la culturile pomicele în condiții naturale.

**Noutatea și originalitatea științifică.** Au fost izolați, identificați și caracterizați bacteriofagii din plantațiile pomicele a Republicii Moldova care lizează bacteriile patogene *E. amylovora*. Bacteriofagii izolați sunt reprezentanți ai familiilor *Myoviridae* și *Siphoviridae*, capabili de a infecta bacteriile independent de grosimea stratului exopolizaharidic al învelișului celular. S-au stabilit dinamica sezonieră a populațiilor de bacteriofagi ai *E. amylovora* în condiții naturale și controlate și s-a demonstrat eficacitatea biologică a lor în inhibarea creșterii bacteriilor *E. amylovora*. S-a demonstrat eficiența biologică a bacteriofagilor izolați în reducerea gradului de infectare a puieților pomicoli cu focul bacterian în condiții de câmp.

**Problema științifică importantă soluționată,** constă în *fundamentarea științifică* a capacităților bacteriofagilor *E. amylovora*, izolați, identificați și caracterizați, de a liza agentul patogen, *ceea ce a condus la elaborarea* elementelor tehnologice de producere a biomasei active a bacteriofagilor identificați pentru combaterea focului bacterian al rozaceelor, *fapt ce a permis* determinarea eficacității lor biologice în reducerea infecției puieților pomicoli în condiții de laborator și în câmp deschis.

**Semnificația teoretică a lucrării** Rezultatele cercetărilor efectuate constituie o contribuție importantă în studierea bazelor teoretice privind interacțiunea bacteriilor patogene *E. amylovora* cu bacteriofagii acestora în țesuturile plantelor gazde în condiții naturale și controlate.

**Valoarea aplicativă a lucrării.** S-a demonstrat eficacitatea biologică a bacteriofagilor izolați în combaterea focului bacterian, ceea ce a permis propunerea bacteriofagilor în combaterea bacteriozelor.

**Implementarea rezultatelor științifice.** Bacteriofagii *E. amylovora* izolați au fost testați în combaterea focului bacterian în livada de măr din Gospodăria agricolă "AgroBrio", comuna Bacioi, raionul Ialoveni. Rezultatele privind particularitățile bioecologice ale bacteriofagilor obținuți în cadrul cercetărilor au fost utilizate la pregătirea cursului de virusologie, pentru studenții Universității de Stat a Moldovei.

## АННОТАЦИЯ

**Самойлова Анна «Применение бактериофагов *Erwinia amylovora* против бактериального ожога плодовых культур», диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, Кишинэу, 2016 г.**

Диссертация состоит из введения, четырех глав, основных выводов и рекомендаций, библиографии из 240 источников. Работа изложена на 109 страницах основного текста, содержит 9 таблиц, 35 рисунков и 2 приложения. По материалам диссертационной работы опубликованы 12 научных работ.

**Ключевые слова:** бактериофаги, *Erwinia amylovora*, бактериальный ожог плодовых, биологическая активность, фаготерапия, биологическая защита

**Область исследований:** защита растений

**Цель работы:** Выявление биологических особенностей патогена *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. и изучение возможности применения бактериофагов в борьбе с бактериальным ожогом плодовых.

**Задачи:** выделение, идентификация и оценка патогенности вирулентных изолятов бактерии *E. amylovora* (Burrill) Winslow et al; выделение и идентификация бактериофагов бактерии *E. amylovora* (Burrill) Winslow et al.; определение особенностей репродукции бактериофагов *E. amylovora* в искусственных и естественных условиях; определение биологической эффективности бактериофагов *E. amylovora* в борьбе с бактериальным ожогом плодовых культур.

**Научная новизна и оригинальность.** В условиях Республики Молдова из растений семейства *Rosaceae* выделены бактериофаги патогенных бактерий *E. amylovora*. Выделенные бактериофаги являются представителями семейств *Myoviridae* и *Siphoviridae*, способных инфицировать бактерии независимо от толщины экзополисахаридной оболочки. Изучена сезонная динамика популяций бактериофагов, лизирующих клетки патогенных бактерий *E. amylovora* в естественных и искусственных условиях. Определена способность выделенных бактериофагов снижать заболеваемость саженцев плодовых бактериальным ожогом в естественных условиях.

**Решенная важная научная проблема** состоит в *научном обосновании* способности выделенных, идентифицированных и охарактеризованных бактериофагов *E. amylovora* лизировать патоген, *что привело к разработке* элементов технологии производства активной биомассы идентифицированных бактериофагов для борьбы с бактериальным ожогом плодовых и *позволило* определить их биологическую активность в подавлении бактериального ожога на саженцах плодовых в контролируемых и естественных условиях.

**Теоретическая значимость.** Результаты проведенных исследований являются вкладом в изучение теоретических основ взаимодействия патогенных бактерий *E. amylovora* и бактериофагов *E. amylovora* в тканях растений-хозяев в искусственных и естественных условиях.

**Практическая ценность работы.** Установлена биологическая эффективность бактериофагов в подавлении развития бактериального ожога, что позволяет рассматривать их в качестве одного из средств борьбы с ожогом семечковых культур.

**Внедрение научных результатов.** Изоляты бактериофагов *E. amylovora* тестировали против бактериального ожога плодовых в яблоневом саду хозяйства «AgroVrigo» коммуны Бачой, Яловенского района. Полученные результаты по описанию бактериофагов легли в основу курса вирусологии, который читается в Молдавском Государственном Университете.

## ABSTRACT

### Samoilova Anna “*Erwinia amylovora* bacteriophage application in the fire blight control“

Thesis for the degree of Doctor in Biological Sciences, Chisinau, 2016, consists of the introduction, four chapters, the main conclusions and recommendations, bibliography of 240 sources. The work is presented on 109 pages of the main text; it contains 9 tables, 35 figures and 2 supplements. The results within the dissertation were published in 12 scientific papers.

**Keywords:** bacteriophages, *Erwinia amylovora*, fire blight, phage therapy, biological protection, biological effectiveness.

**Domain of research:** plant protection

**Aim of research:** To determine biological properties of bacteria *E. amylovora* and bacteriophages *E. amylovora* and to study the possibility of the *E. amylovora* bacteriophages application in the fire blight control.

**Objectives:** isolation, identification and pathogenicity estimation of the virulent bacteria *E. amylovora* (Burrill) Winslow et al.; isolation and identification of the virulent bacteria *E. amylovora* bacteriophages; determination of the *E. amylovora* bacteriophages growth particularities under the artificial and natural conditions; determination of the *E. amylovora* bacteriophages biological effectiveness in the fire blight control under the natural conditions.

**Scientific novelty and originality.** Bacteriophages, active against fire blight pathogen bacteria *E. amylovora* were isolated from *Rosaceae* in the Republic of Moldova. The isolated bacteriophages were identified and characterized as members of *Myoviridae* и *Siphoviridae* viruses' families. They are able to infect bacterial host cells independently of the exopolysaccharide layer thickness. The seasonal dynamics of the bacteriophages concentration in the host plants under the artificial and natural conditions is determined. The effectiveness of the bacteriophages to control bacteria *E. amylovora* growth is determined in the laboratory experiments. The ability of some isolates of bacteriophages to reduce the disease rate of the fruit seedlings under the natural conditions is determined.

**The important scientific problem solved in the respective domain** consists in the *scientific substantiation* of the isolated, identified and characterized *E. amylovora* bacteriophages capacity to lyse pathogen, *which lead* to elaboration of the technological elements of the active phage biomass production for fire blight control and *allowed* to determine phages biological effectiveness against fire blight in the laboratory and field conditions.

**The theoretical significance.** The results of the investigations, which have been carried out, are the contribution in the study of the theoretical background of the interactions between fire blight pathogen bacteria *E. amylovora* and bacteriophages *E. amylovora* in the tissues of the hosts' plants under the artificial and natural conditions.

**The practical significance of the work.** The biological effectiveness of the *E. amylovora* bacteriophages in the fire blight control has been determined. This allows to consider bacteriophages as a possible tool for fire blight control.

**Implementation of scientific results:** The isolated bacteriophages were tested in the fire blight control in the apple orchard of the enterprise “AgroBrio”, comuna Bacioi, Ialoveni district. The obtained results of the bio ecological features of the *E. amylovora* bacteriophages investigation were used for the virology course elaboration at the State University of the Republic of Moldova.

**SAMOILOVA Anna**

**APLICAREA BACTERIOFAGILOR *ERWINIA AMYLOVORA* ÎN  
COMBATEREA FOCULUI BACTERIAN AL CULTURILOR  
POMICOLE**

**411.09. Protecția plantelor**

**Autoreferatul tezei de doctor în științe biologice**

Aprobat spre tipar: 12.05.2016

Formatul hîrtiei 60x84 1/16

Hîrtie ofset. Tipar ofset.

Tiraj 50 ex.

Coli de tipar: 2,0

Comanda nr.51