

АКАДЕМИЯ НАУК МОЛДОВЫ
ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ, ФИЗИОЛОГИИ И ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

На правах рукописи
У.Д.К. 632.937.15:634.10

САМОЙЛОВА АННА

ПРИМЕНЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ *ERWINIA AMYLOVORA*
ПРОТИВ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА ПЛОДОВЫХ
КУЛЬТУР

411.09 – Защита растений

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научный руководитель:

Волощук Леонид
доктор хабилитат биологических
наук, профессор исследователь

Автор:

Самойлова Анна

КИШИНЕВ, 2016

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

Teză de doctor în științe biologice

Conducător științific:

Voloșciuc Leonid

doctor habilitat în științe biologice,
profesor cercetător

Autorul:

Samoilova Anna

CHIȘINĂU, 2016

© Анна Самойлова, 2016

СОДЕРЖАНИЕ

АННОТАЦИЯ (русский, румынский, английский).....	5
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	8
ВВЕДЕНИЕ.....	9
1. ФАГОТЕРАПИЯ В БОРЬБЕ С БАКТЕРИОЗАМИ РАСТЕНИЙ.....	15
1.1. Общая характеристика возбудителя бактериального ожога плодовых – бактерии <i>Erwinia amylovora</i>	15
1.2. Защита растений от бактериального ожога плодовых.....	22
1.3. Бактериофаги как средство борьбы с бактериозами.....	27
1.4. Бактериофаги <i>Erwinia amylovora</i>	37
1.5. Выводы к главе 1.....	41
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	43
2.1. Место и условия проведения опытов	43
2.2. Материалы и методы исследований	45
2.3. Выводы к главе 2	51
3. ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИИ <i>ERWINIA AMYLOVORA</i> И БАКТЕРИОФАГОВ <i>ERWINIA AMYLOVORA</i>.....	53
3.1. Выявление и идентификация возбудителя бактериального ожога плодовых бактерии <i>Erwinia amylovora</i>	53
3.2. Выделение и идентификация бактериофагов <i>Erwinia amylovora</i>	65
3.3. Выводы к главе 3.....	74
4. ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ <i>ERWINIA AMYLOVORA</i> В БОРЬБЕ С БАКТЕРИАЛЬНЫМ ОЖОГОМ ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР	75
4.1. Система «бактериофаг <i>E. amylovora</i> – бактерия <i>E. amylovora</i> – растение-хозяин».....	75
4.2. Применение бактериофагов <i>E. amylovora</i> в борьбе с бактериальным ожогом плодовых	86
4.3. Выводы к главе 4.....	107
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	108
БИБЛИОГРАФИЯ.....	110
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	127
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Акт о внедрении (Молдавский Государственный Университет).....	128
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Акт о внедрении (Хозяйство «AgroVrio»).....	129
ДЕКЛАРАЦИЯ ОБ ОТВЕТСТВЕННОСТИ.....	130
CURRICULUM VITAE	131

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 «AgroVgiu» коммуны Бачой, Яловенского района. Полученные результаты по описанию бактериофагов легли в основу курса вирусологии, который читается в Молдавском Государственном Университете.

ADNOTARE

Anna Samoilova "Aplicarea bacteriofagilor *Erwinia amylovora* în combaterea focului bacterian al culturilor pomicole", 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 al patogenului *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. și bacteriofagii *Erwinia amylovora* și studierea posibilității de aplicarea bacteriofagilor *Erwinia amylovora* în combaterea focului bacterian.

Obiectivele: izolarea, identificarea 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 pomicole în condiții naturale.

Noutatea și originalitatea științifică. Au fost izolați, identificați și caracterizați bacteriofagii din plantațiile pomicole din Republicii Moldova care lizează bacteriile patogene *E. amylovora*. Bacteriofagii izolați sunt reprezentanți ai familiilor *Myoviridae* și *Siphoviridae*, capabili de a infecta bacteriile independente 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 puietilor pomicoli cu focul bacterian în condițiile 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 puietilor 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 permite propunerea bacteriofagilor în calitate de măsură de combatere a 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.

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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГЛ – ацетилгомосеринлактон

АИ – автоиндукторы

БОЕ – бляшко образующие единицы

ИФА – иммуноферментный анализ

КОЕ – колониеобразующие единицы

ЛПС – липополисахариды

МАЛДИ (MALDI) – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (*Matrix Assisted Laser Desorbption/Ionization*)

пн – пара нуклеотидов

ПЛФ – пептидогликан-лизирующие ферменты

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РБЛ – регуляторные белки лизиса

ССТТ – секреторная система третьего типа

ЭПС – экзополисахариды

CRISPR – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

ЕТИ – эффектор активируемая устойчивость (*effector-triggered immunity*)

kb – тысяча пар нуклеотидов (*kilo base pairs*)

LAMP – опосредованная образованием петель изотермическая амплификация (*loop-mediated isothermal amplification*)

PTI – иммунитет, активируемый молекулярными образцами патогена (*pattern-triggered immunity*)

dsp гены – гены, ответственные за индуцирование болезни (*disease-specific*)

hrp гены – гены реакции гиперчувствительности и патогенности (*hypersensitive response and pathogenicity*)

QS – чувство общности (*quorum sensing*)

tls гены – гены, кодирующие большие субъединицы терминаз (*terminase large subunits*)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Бактериальный ожог плодовых (*fire blight*) поражает растения семейства *Rosaceae*. В настоящее время известно 129 видов растений из 37 родов семейства *Rosaceae*, чувствительных к поражению этим бактериозом [94]. Особенно серьезный ущерб болезнь наносит насаждениям айвы, груши, яблони. В США потери, причиненные этой болезнью, достигают 100 миллионов долларов в год [129]. В Румынии, где болезнь была впервые выявлена в 1992 году, только с 2004 по 2006 гг. площадь насаждений, пораженных бактериальным ожогом, выросла на 5,3% [83]. В 1990-х годах вирулентные штаммы возбудителя бактериального ожога плодовых, бактерии *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al, обнаружили в Республике Молдова [26]. В течение нескольких лет бактериальный ожог практически уничтожил промышленные насаждения айвы в республике и нанёс серьёзный ущерб садам яблони и груши [1]. В результате проведенных исследований, в стране была приготовлена антисыворотка к вирулентным бактериям *E. amylovora* [6], и на ее основе подобраны иммунобиотехнологические методы диагностики возбудителя ожога плодовых культур [24].

В разные годы проявление болезни бывает различным и зависит от таких факторов как среднесуточная температура, относительная влажность воздуха, наличие насекомых-переносчиков, общее состояние поражаемых растений (наличие механических повреждений, физиологические особенности и др.), а также наличие патогенных бактерий в насаждениях. Изучение указанных факторов служит основанием для разработки возможно более эффективных систем прогнозирования распространения заболевания.

Современные методы борьбы с бактериальным ожогом, учитывают особенности развития растений-хозяев, патогенных бактерий и их взаимодействие, и заключаются в следующем:

- обрезка пораженных органов растений с последующим уничтожением;
- обработка медьсодержащими препаратами;
- обработка антибиотиками;
- использование антагонистических микроорганизмов;
- использование методов генной инженерии, как для повышения устойчивости

растений-хозяев, так и для устранения различных факторов вирулентности патогена.

Итак, в качестве мер борьбы с бактериальным ожогом плодовых применяются комплексные мероприятия, направленные на уменьшение количества патогена в садах и предотвращение заражения возбудителем: агротехнические, химические, селекционно-генетические.

Перечисленные методы снижают количество патогена в насаждениях плодовых, однако у каждого из них имеются недостатки. Так, в случае применения медьсодержащих препаратов существует опасность накопления в растениях и в почве ионов меди, которые ингибируют развитие не только патогенных, но и других микроорганизмов, а также обладают фитотоксичностью. Применение антибиотиков эффективно только для чувствительных к антибиотикам популяций патогенов, однако из-за появления устойчивых штаммов оно теряет свою эффективность. Эффективность бактерий-антагонистов ниже, чем при использовании антибиотиков. Использование трансгенных организмов способно вызвать непредсказуемые изменения, как в экосистемах, так и в организмах человека и животных, а значит, не может быть признано основным в защите растений от бактериального ожога.

Одним из средств биологической борьбы с бактериальным ожогом могут быть бактериофаги, лизирующие клетки бактерий *E. amylovora*. Главное преимущество бактериофагов перед другими средствами борьбы с бактериозами состоит в том, что они являются облигатными паразитами бактерий и естественным компонентом экосистем, поэтому их можно использовать для профилактики и сдерживания развития бактериального ожога на всех стадиях развития растения. Основная проблема использования бактериофагов заключается в том, что к ним, как и к антибиотикам, у бактерий со временем вырабатывается устойчивость. В последние годы в ведущих лабораториях мира изучают возможность применения бактериофагов в борьбе с возбудителем ожога плодовых. В Европе и Америке выделены штаммы бактериофагов, вирулентные к бактериям *E. amylovora*. В 2014 в Италии Mazzucchi U. и др. зарегистрировали патент на применение бактериофагов *E. amylovora* M9 как метода, альтернативного химическим обработкам против бактериального ожога в саду [181].

Известно, что эффективность бактериофагов, как и многих биологических агентов, зависит от основных факторов окружающей среды и особенностей инфицируемого организма. Однако этот вопрос изучен недостаточно хорошо. Как и в других странах, в Республике Молдова мало данных о видовом разнообразии местных изолятов бактериофагов, чувствительности бактерий к этим изолятам, а также о взаимодействии микроорганизмов в кроне растений. Работы по выделению и идентификации бактериофагов *E. amylovora* в Республике Молдова не проводились. Слабая изученность и отсутствие данных о значении бактериофагов в профилактике и сдерживании распространения бактериального ожога обусловили выбор данной темы исследований.

Цель исследований: Выявление биологических особенностей патогена *Erwinia amylovora* и изучение возможности применения бактериофагов в борьбе с бактериальным ожогом плодовых.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Выделить, идентифицировать и охарактеризовать патогенность вирулентных изолятов бактерии *E. amylovora* (Burrill) Winslow et al.
2. Выделить и идентифицировать бактериофаги возбудителя бактериального ожога плодовых бактерий *E. amylovora* (Burrill) Winslow et al.
3. Определить особенности роста бактериофагов *E. amylovora* в искусственных и естественных условиях.
4. Определить биологическую эффективность бактериофагов *E. amylovora* в борьбе с бактериальным ожогом плодовых на растениях, произрастающих в естественных условиях.

Научная новизна и оригинальность. В условиях Республики Молдова выделены, идентифицированы и охарактеризованы бактериофаги из семейств *Myoviridae* и *Siphoviridae*, которые лизируют патогенные изоляты бактерий *E. amylovora* и характеризуются наличием сокращающихся (*Myoviridae*) и несокращающихся (*Siphoviridae*) хвостов. Отличительной особенностью бактериофагов из семейства *Myoviridae* является их способность инфицировать клетки патогенных бактерий *E. amylovora* независимо от толщины их экзополисахаридного слоя. Показана биологическая эффективность некоторых выделенных бактериофагов в подавлении развития бактериального ожога на саженцах плодовых (89,0 % по сравнению с контролем).

Теоретическая значимость проведенных исследований заключается в том, что с использованием классических и современных методов в условиях Республики Молдова выделены и охарактеризованы ранее не описанные элементы, а именно: бактериофаги из семейств *Myoviridae* и *Siphoviridae*, с линейной двухцепочечной ДНК без фосфолипидной оболочки, с длинными сокращающимися и несокращающимися хвостами, способные разрушать патогенные бактерии *E. amylovora*.

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 бактериофагов для борьбы с бактериальным ожогом плодовых и позволило определить их биологическую активность в подавлении бактериального ожога на саженцах плодовых в лабораторных и естественных условиях.

Практическая ценность работы. Показана биологическая эффективность бактериофагов в подавлении развития бактериального ожога, которая составила 89%. Это позволяет рассматривать бактериофаги в качестве одного из средств борьбы с ожогом семечковых культур. Установлено, что при культивировании бактерий *E. amylovora* в бульоне Лурия Бертрани при температуре +28⁰С для приготовления фаголизата, необходимо вносить бактериофаги в культуру бактерий через 3 часа с момента посева бактерий в питательную среду. Концентрация фаголизата должна быть не меньше, чем 10⁷БОЕ/мл.

Основные тезисы, выдвигаемые на защиту:

1. Семечковые культуры в Республике Молдова поражаются патогенными бактериями *E. amylovora*. Отсутствие эффективных средств защиты плодовых культур от бактериального ожога вызывает необходимость разработки новых мер борьбы с заболеванием, в частности, использования облигатных паразитов бактерий – бактериофагов.

2. Выделенные изоляты бактериофагов относятся к семействам *Myoviridae* и *Siphoviridae* и представляют собой хвостатые вирусы. Способность фагов из семейства *Myoviridae* инфицировать бактериальные клетки не зависит от степени развития экзополисахаридного слоя бактерий-хозяев.

3. Полученные бактериофаги как высокоспецифичные внутриклеточные паразиты бактерий, регулирующие плотность популяций фитопатогенных бактерий, при отсутствии высокоэффективных средств борьбы с бактериозами могут служить одним из элементов в системе защиты садов от бактериального ожога плодовых.

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

Апробация научных результатов. Работа выполнена в рамках институционального проекта 06.407.022F.

Материалы работы представлены и обсуждены на заседаниях лаборатории и ученого совета института, а также на научных конференциях и симпозиумах: «Синантропизация растений и животных» (Иркутск, 2007), «Интегрированная защита растений – стратегия и тактика» (Минск, 2011), «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем» (Краснодар, 2012), «Защита растений – достижения и перспективы» (Кишинэу, 2009), «Защита растений – проблемы и перспективы» (Кишинэу, 2012),

«Pathogens and antagonists: the multiple role of bacteria in biological plant protection», Kyrgyz-Uzbek-Kazakh-German multilaterated programme for cooperation BIOPROTECT (Bishkek, Almaty, 2014); на XVIII Международном Конгрессе по защите растений. International Plant Protection Congress Mission possible: food for all through appropriate plant protection (Берлин, 2015); «Защита растений – достижения и перспективы», (Кишинэу, 2015); “Genetics for Biocontrol”, (Geisenheim, 2015).

Краткое изложение диссертации.

В главе 1 изложено современное представление о возбудителе бактериального ожога плодовых бактерии *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow et al. и о мероприятиях, разработанных для борьбы с этим опасным бактериозом. Отмечено, что несмотря на большое количество уже имеющихся данных о строении и свойствах патогена, многое до сих пор неясно и требует детального изучения. Приводятся имеющиеся в настоящее время данные о строении и свойствах бактериофагов. Описано применение бактериофагов как средства борьбы с бактериальными заболеваниями. Приведено мнение исследователей о преимуществах, недостатках и способах преодоления проблем применения фаготерапии в борьбе с бактериозами, в целом, и с бактериальным ожогом плодовых, в частности. Отмечено, что основными недостатками фаготерапии являются: 1) высокая чувствительность фагов к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды; 2) способность бактериофагов переносить участки геномов, кодирующие нежелательные свойства бактерий-хозяев. В то же время, такие преимущества фаготерапии как воздействие только на бактерии-хозяева и отсутствие опасности для других организмов, а также относительная простота производства препаратов на основе бактериофагов, позволяют утверждать, что бактериофаги способны сдерживать проявление бактериального ожога плодовых и могут применяться в комплексе с другими мероприятиями по предотвращению распространения данного бактериоза.

В главе 2 описаны объекты исследований и методы, с помощью которых были выделены, охарактеризованы и идентифицированы бактерии *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow et al. и бактериофаги, способные лизировать клетки патогена. В работе использованы как классические методы выделения бактерий и бактериофагов (метод выделения фитопатогенных бактерий Кирай З. и др., 1974 [19]; метод посева патогенных бактерий на стандартные и диагностические питательные среды [58,185]; метод агаровых слоев для выделения бактериофагов, Адамс, 1961 [7]), так и современные методы идентификации микроорганизмов (методы электронной микроскопии и ПЦР). Опыты проводили как в лаборатории, так и в условиях, естественных для роста растений.

В главе 3 дана характеристика выделенных патогенных бактерий *E. amylovora* и бактериофагов, лизирующих клетки патогенных бактерий *E. amylovora*. Описаны культурально-морфологические свойства бактерий. Приведена сравнительная характеристика вирулентности и индуцированной реакции гиперчувствительности изолятов *E. amylovora*, выделенных из растений подсемейства *Prunoideae*. Определена динамика численности бактерий при культивировании в жидкой питательной среде. Описаны культурально-морфологические свойства выделенных изолятов бактериофагов. Установлено минимальное количество бактериофагов, способных формировать негативные колонии на бактериальном газоне на плотной питательной среде.

В главе 4 приведены результаты изучения сезонной динамики численности популяций бактериофагов в тканях растений-хозяев в естественных и в лабораторных условиях. Описаны результаты испытания бактериофагов в подавлении бактериального ожога плодовых в условиях лабораторных опытов, вегетационного и полевого опытов. Определена биологическая эффективность некоторых бактериофагов в подавлении развития бактериального ожога *in vivo*. На основании результатов проведенных исследований обсуждается возможность применения отдельных изолятов бактериофагов как одного из средств борьбы с бактериальным ожогом плодовых.

В общих выводах приведены основные результаты проведенных исследований.

В практических рекомендациях даны рекомендации по использованию бактериофагов, вирулентных по отношению к бактериям *E. amylovora*, в профилактике и лечении бактериального ожога.

1. ФАГОТЕРАПИЯ В БОРЬБЕ С БАКТЕРИОЗАМИ РАСТЕНИЙ

1.1. Общая характеристика возбудителя бактериального ожога плодовых – бактерии *Erwinia amylovora*

Бактериальный ожог плодовых – *fire blight* – поражает представителей семейства *Rosaceae*. Особенно серьезный ущерб заболевание наносит насаждениям айвы, груши, яблони.

Симптомы заболевания начинают проявляться весной во время цветения. Цветки внезапно увядают, приобретают сначала коричневый цвет, а затем чернеют, но остаются на деревьях. Пораженные побеги изгибаются в виде крючка. На коре, молодых побегах и завязях выделяется экссудат в виде капель молочно-белого цвета. На воздухе экссудат буреет. Кора растрескивается, в сухую погоду подсыхает и четко отделяется от здоровой ткани. Древесина под корой в местах поражения приобретает желто-оранжевый цвет. Завязи и незрелые плоды, пораженные весной, становятся красно-коричневыми, сморщиваются и остаются на ветках. Наиболее интенсивно развитие заболевания происходит весной во время цветения и роста побегов и осенью во время вторичного цветения [16, 26, 223].

Различают несколько форм болезни: ожог подвоев, ожог побегов, ожог цветков. Наиболее опасен ожог цветков, так как через завязь бактерии легко проникают в растения и распространяются по всем его органам. Кроме того, бактерии – возбудители бактериального ожога могут находиться на поверхности растений в эпифитном состоянии. Именно эпифитные популяции бактерий на цветках в большинстве случаев служат причиной распространения бактериального ожога [189].

Возбудитель заболевания – бактерия *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Roders and Smith 1920. Синонимы: *Micrococcus amylovorus* Burrill 1882, *Bacterium amylovorus* (Burrill) Chester 1897, *Bacillus amylovorus* (Burrill) Trevisan 1889 [9,185]. Это грамотрицательные бактерии, клетки которых представляют собой палочки размером 1,1-1,6 x 0,6-0,9 мкм с закругленными концами и с перитрихальным расположением жгутиков.

Распространение бактериального ожога плодовых. Впервые заболевание было описано в 1780 г. в Северной Америке [223]. В 1924 году болезнь проникла в Италию и довольно широко распространилась по территории Европы [11]. С момента первого обнаружения бактериального ожога в 1780 году в Северной Америке, к настоящему времени заболевание выявлено практически во всех регионах мира с развитым плодоводством (таблица 1.1).

Таблица 1.1. Распространение бактериального ожога плодовых в мире

Время выявления (год)	Страна	Литературный источник
1780	США	[223]
1840	Канада	[223]
1919	Новая Зеландия	[223]
1924	Италия	[11]
1943	Мексика	[223]
1957	Англия	[223]
1959	Чили	[223]
1962	Египет	[223]
1966	Польша	[223]
1967	Гватемала	[223]
1968	Дания	[223]
1971	ФРГ	[223]
1972	Франция	[223]
	Бельгия	[223]
1989	Швейцария	[113]
	Армения	[18]
1992	Румыния	[49]
1995	Югославия	[106]
	Косово	[221]
	Сербия	[107]
1997	Республика Молдова	[26,174]
Начало 2000-х	Болгария	[64]
	Украина	[8]
2003	Россия	[130]
2005	Литва	[51]
2007	Латвия	[169]
	Белоруссия	[141]
2011	Турция	[220]
2012	Казахстан	[87]
2013	Саудовская Аравия	[45]

В Республике Молдова, по сообщению Вердеревского Д. Д. [10], еще в 1938 году Т. Сэвулеску обнаружил очаг бактериального ожога на севере страны, а также в плодовом питомнике у города Хотин. Однако при последующих многократных обследованиях плодовых насаждений это опасное заболевание не удалось вновь обнаружить в пределах Республики. В 1991 году бактериальный ожог плодовых культур отмечен на юге Молдовы на груше в с. Готешть, района Кантемир на площади 131 га, а потом на 49 га айвы [155]. В 1996-1997 гг. болезнь приобрела эпифитотийный характер развития. В 1997 г. Николаев А. Н. и др., сообщили о выявлении и идентификации возбудителя бактериального ожога на территории Республики Молдова [36,174].

Методы идентификации возбудителя бактериального ожога. Самым простым и надежным методом идентификации патогенных бактерий *E. amylovora* является метод заражения зеленых плодов груши культурой бактерий – метод Уайта [223]. Основные недостатки этого метода заключаются в том, что, во-первых, в распоряжении исследователей не всегда имеются незрелые плоды груши. Во-вторых, метод Уайта недостаточно чувствителен для выявления невысоких концентраций бактерий.

Кроме того, разработаны методы идентификации бактерий выращиванием на диагностических питательных средах. Наиболее известна и широко применяется питательная среда ММ2Сu, содержащая ионы меди [59], на которой колонии патогенных бактерий *E. amylovora* вырастают желтого цвета, что обусловлено наличием одного из метаболитов бактерий 6-тиогуанина [232]. Питательные среды применяются для определения количества экзополисахаридов (ЭПС), которые продуцирует патоген [56,58]. Разработаны также серологические методы диагностики бактериального ожога. Применение метода иммуноферментного анализа (ИФА) позволило выделить 4 биовара бактерий *E. amylovora* [167]. В 1997 г. в Республике Молдова была приготовлена антисыворотка к бактерии *E. amylovora* [6] и на ее основе подобраны иммунобиотехнологические методы диагностики возбудителя ожога плодовых [20].

Для идентификации бактерий *E. amylovora* и определения их систематического положения широко применяются методы молекулярной биологии [52,193], такие как матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация, (МАЛДИ, MALDI – Matrix Assisted Laser Desorbition/Ionization) [183], метод LAMP (опосредованная образованием петель изотермическая амплификация (*loop-mediated isothermal amplification, LAMP*) [76]. Изучены CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) разных штаммов бактерий *E. amylovora* [158] и др. Применение современных методов молекулярной диагностики позволяет выявить как особенности патогена, которые способствуют его эффективному

выживанию в различных условиях, так и неизвестные ранее отличия среди штаммов бактерий *E. amylovora*.

Штаммы бактерий *E. amylovora*. По способности инфицировать различные растения-хозяева штаммы *E. amylovora* делят на три группы: штаммы, выделенные из *Prunoideae*, из *Rosoideae* (*Rubus* spp.), и из груши грушелистной (Asian pear = *Pyrus pyrifolia* (Burm.) Nak.) [240]. Установлено, что продукты фотосинтеза растений-хозяев не влияют на специфичность инфицирования бактериями различных растений. В то же время, штаммы *E. amylovora*, выделенные из яблони (*Malus*) и малины (*Rubus*), различаются по аминокислотному составу ряда белков [71]. Обнаружено, что ген *eop1*, который кодирует структуру белков флагеллинов, у штаммов *E. amylovora*, выделенных из малины, отличается по строению от этого гена у штаммов *E. amylovora*, выделенных из *Prunoideae* [47].

Mizuno A. и др. (2002) на основании различий в строении липополисахаридов (ЛПС) выявили серологические различия между 4 биоварами *E. amylovora*, (биовары 1 и 2 из растений *Maloideae*, произрастающих за пределами Японии, 3 – из *Rubus idaeus* L. и 4 – возбудитель ожога побегов груши в Японии) [167].

У штаммов бактерий возбудителей бактериального ожога обнаружены различия в составе и строении ЭПС. Так, в геноме *E. pyrifoliae* отсутствует ген левансахарозы (*lsc*) [240]. Кроме того, сравнение структуры основного фактора вирулентности *E. amylovora* амиловорана показало, что амиловоран, который продуцируют штаммы *E. amylovora*, выделенные из *Malaceae* sp., состоит из пентасахарида и 30–40% гексасахаридов, тогда как амиловоран, который продуцируют штаммы *E. amylovora*, выделенные из *Rubus* sp., состоит только из пентасахарида [154].

Сравнение четырех штаммов *Erwinia*: *E. amylovora* Ea110, патогенного на яблоне и груше, *E. amylovora* MR1, патогенного только на *Rubus* spp., *E. pyrifoliae* Ep1/96, возбудителя ожога побегов груши грушелистной и штамма Ejp556, возбудителя ожога побегов груши в Японии, показало, что перечисленные штаммы отличаются по составу компонентов секреторной системы третьего типа (ССТТ). Предполагается, что незначительные различия структуры ЭПС, ЛПС и транспортных белков могут быть важны при взаимодействии патогенов с их хозяевами [219]. Однако причины специфичности штаммов *E. amylovora* в отношении растений-хозяев и различия в вирулентности до сих пор не совсем понятны [240].

Вирулентность бактерий *E. amylovora*. При взаимодействии с растениями патогенные бактерии используют разнообразные приемы для наиболее эффективного развития в клетках и тканях хозяев. Когда бактерия соприкасается с растением-хозяином,

прежде всего запускается механизм системы секреции третьего типа (ССТТ). ССТТ осуществляет доставку эффекторных белков бактерий непосредственно в клетку эукариотического хозяина. Структурные протеины ССТТ у бактерий *E. amylovora* кодируются *hrp* генами реакции гиперчувствительности и патогенности (*hrp – hypersensitive response and pathogenicity genes*) [177, 214]. Гены *hrp* кодируют два типа секреторных белков: белки эффекторы, которые доставляются в клетки растений и внеклеточные сопутствующие белки, в том числе и харпины [44].

Белки харпины являются элиситорами реакции гиперчувствительности у устойчивых растений-хозяев и у неспецифических растений-хозяев [54, 131, 211, 230]. С кластером *hrp* генов связан участок *dsp (disease-specific)*, ответственный за индуцирование болезни, но не имеющий отношения к проявлению реакции гиперчувствительности [54,66].

Показано, что харпин HrpN бактерии *E. amylovora* необходим для транслокации основного эффектора ССТТ – белка DspA/E в клетки растений-хозяев [65]. В клетках растений DspA/E, предположительно, взаимодействует с специфическими рецепторами – подобными серин/треонин киназами растений-хозяев, тем самым вмешиваясь в сигнальную систему растений [164]. Поскольку присутствие бактерии и выделяемые ею HrpN быстро распознаются растением-хозяином, *E. amylovora* экспрессирует ключевые гены ССТТ за очень короткое время – в течение 24-48 часов после инокуляции и в строго определенных соотношениях под контролем регулятора *hrpL*. Это позволяет бактерии подавить продуцирование растением салициловой кислоты и, тем самым, противодействовать проявлению защитных реакций [182]. Таким образом, основная функция ССТТ заключается в том, чтобы обеспечить доставку в клетки растений белков, которые запускают инфекционный процесс. Белки патогена, которые доставляются в клетку макроорганизма, вызывают там нарушение сигнальных каскадов, контролирующих защитный ответ клетки хозяина.

На следующей стадии инфекционного процесса у бактерий важную роль играет синтез ЭПС. Основные ЭПС, синтезируемые бактериями *E. amylovora*, это амиловоран и леван. Амиловоран – это полимер из пентасахаридных единиц, которые обычно состоят из четырех остатков галактозы и одного остатка глюкуроновой кислоты [154, 175]. Амиловоран способствует передвижению бактерий внутри растения [67]. Штаммы *E. amylovora*, неспособные продуцировать амиловоран, являются непатогенными, не могут передвигаться по сосудам растений [57], формировать биопленки и быстро погибают при инокуляции растений [133]. Синтез амиловорана у бактерий *E. amylovora* происходит под контролем двухкомпонентной регуляторной системы Rcs фосфорилирования (*Rcs – phosphorelay two-component regulatory system*) [228].

Леван – это гомополимер из остатков фруктозы, синтезированный из сахарозы с помощью фермента левансахарозы [112]. Как и амиловоран, леван участвует в формировании биопленок и обеспечивает защиту бактерий от неблагоприятных факторов окружающей среды [57]. То есть, ЭПС выполняют как защитные функции, так и обеспечивают эффективную колонизацию бактериями тканей растений.

При колонизации бактериями растений-хозяев значительную роль играет метаболизм углеводов в клетках бактерий. У *E. amylovora* описаны гены, специфически вовлеченные в усвоение сахарозы, сорбитола [43, 67] и галактозы [165], экспрессия которых оказывает влияние на вирулентность бактерий при заражении растений в естественных условиях.

Комплекс протеинов транспортной системы AcrAB (*aerobic respiratory control*) выводит из бактериальной клетки продукты метаболизма и важен для вирулентности бактерий *E. amylovora*, так как обеспечивает устойчивость бактерий к фитоалексинам [77].

Известно, что для эффективной колонизации цветков бактериям необходима подвижность [55, 80]. Более подвижные бактерии являются более вирулентными при инфицировании устойчивых сортов яблони [229]. Способность образовывать биопленки делает бактерии чрезвычайно устойчивыми к воздействию внешней среды, в частности, почти в 1000 раз повышает резистентность бактерий к антибиотикам [104].

В вирулентности бактерий *E. amylovora* важную роль играют сидерофор десферриоксамин E, который позволяет усваивать железо из тканей растений и предохраняет бактерии от одной из защитных реакций растений – окислительного стресса [85, 127], а также металлопротеаза PrtA [238]. Описаны такие факторы вирулентности как регуляторная РНК *rsmB* [153], плазмида *pEA29*, кодирующая ряд потенциально вирулентных генов, в том числе и оперон, регулирующий биосинтез тиамина, предположительно, влияющего на продуцирование амиловорана [157].

Один из важных факторов вирулентности бактерий *E. amylovora* – это плазмида *pEA29*. Однако в 1996 году в Испании рядом с питомником, где была зафиксирована вспышка бактериального ожога, из боярышника был выделен атипичный изолят *E. amylovora*. Он вызывал характерные симптомы бактериального ожога, был вирулентен на зеленых плодах груши и идентифицирован как *E. amylovora*, но методом ПЦР с использованием праймера, основанного на последовательности *pEA29*, не распознавался. Выяснилось, что выделенный штамм не содержал плазмиду *pEA29* [151]. Дальнейшее изучение атипичного штамма показало, что он содержал ранее неизвестную плазмиду *pEI70* [152].

Данные литературы свидетельствуют, что существенную роль в патогенности бактерий играет механизм *quorum sensing* – «чувство общности» [12] или «чувство кворума» [17]. Термин «*quorum sensing*» отражает способность бактерий регулировать экспрессию генов путем накопления сигнальных молекул – низкомолекулярных соединений, продуктов вторичного метаболизма. Системы *quorum sensing* включают два основных компонента: низкомолекулярные сигнальные молекулы (автоиндукторы) различной природы, диффундирующие из клеток в среду и обратно и рецепторные регуляторные белки, с которыми взаимодействуют сигнальные молекулы [15]. Сигнальные молекулы регулируют споруляцию, конъюгацию, биолюминисценцию, деление и агрегацию клеток, вирулентность и т. д. [12].

Обнаружены три основные сигнальные системы бактерий: АИ-1, различная у грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также общая для всех бактерий, универсальная система – АИ-2. Кроме того, в клетках бактерий энтерогеморрагической кишечной палочки (*enterohemorrhagic Escherichia coli*) обнаружены автоиндукторы АИ-3, которые не содержат фуранового кольца и представляют собой соединения ароматической природы [226].

У бактерий рода *Erwinia* выявлены обе сигнальные системы – АИ-1 и АИ-2 [53, 233]. В 2005 году [168] впервые были получены генетические и фенотипические доказательства существования системы *quorum sensing* у *E. amylovora*. Было установлено, что эта бактерия продуцирует типичную для грамотрицательных бактерий молекулу-автоиндуктор с характеристиками ацетилгомосеринлактона (АГЛ) – N-ацетилгомосеринлактон, которая регулирует у *E. amylovora* экспрессию таких факторов вирулентности как синтез полисахаридов левана и амиловорана. Авторы установили, что у *E. amylovora* АГЛ регулируют экспрессию генов *srlMR* (контролирует поглощение сорбитола), *hrpL* (контролирует секреторную систему 3-его типа), *foxR* (рецептор десферриоксиамина), *ams* (гены синтеза амиловорана). Было обнаружено, что при увеличении плотности бактериальных клеток от 1×10^8 КОЕ/мл до 3×10^8 КОЕ/мл продуцирование ЭПС и активность левансахарозы увеличивались в 15-20 раз. Показано, что АГЛ способствуют толерантности *E. amylovora* к активным формам кислорода. Это важный фактор выживаемости патогенов в тканях растений, поскольку окислительный стресс является одной из защитных реакций растений-хозяев на проникновение патогенов. Кроме того, АГЛ усиливают толерантность *E. amylovora* к органическим растворителям и оказывают влияние на проявление симптомов поражения яблони бактериальным ожогом в естественных условиях.

Предполагается, что система *quorum sensing* у *E. amylovora* сложнее, чем у других бактерий [105]. В 2007 был осуществлено секвенирование гена *luxS* АИ-2–синтазы у *E. amylovora*. Однако проведенные авторами исследования, показали, что этот ген оказывает влияние только на метаболизм бактерий, но не участвует в механизме *quorum sensing*, а рецепторы LuxP/LuxQ сигнальной системы АИ-2 у *E. amylovora* отсутствуют [192]. Позже было установлено, что гены *luxS* у *E. amylovora* влияют на подвижность клеток бактерий, продуцирование ЭПС, вирулентность на листьях груши, толерантность к пероксиду водорода. Однако молекулярные основы *luxS* зависимой регуляции еще предстоит выяснить [105]. Установлено, что положительным регулятором продуцирования амиловорана и образования биопленок и отрицательным регулятором плавательной и роящейся подвижности, экспрессии генов ССТТ и вирулентности у *E. amylovora* является сигнальная молекула циклический дигуанозинмонофосфат [91].

Таким образом, экспериментальные данные показывают, что при заражении разных тканей растений *E. amylovora* использует различные стратегии вирулентности [239].

1.2. Защита растений от бактериального ожога плодовых

Для борьбы с бактериальным ожогом плодовых широко применяются медьсодержащие препараты. Однако установлено, что в присутствии меди бактерии *E. amylovora* переходят в жизнеспособное, но некультивируемое состояние (*viable-but-nonculturable* VBNC). В таком состоянии бактерии жизнеспособны, но не растут на твердой питательной среде. В благоприятных условиях бактерии восстанавливают свою патогенность и опасность для растений-хозяев [179]. Применение медьсодержащих препаратов, из-за особенностей поведения бактерий в присутствии меди, рекомендуется в начале сезона, так как это помогает уменьшить количество инокулюма в саду [203].

Кроме того, медьсодержащие препараты фитотоксичны. Оценка их фитотоксичности для цветков яблони сорта ‘Gloster’ в саду показала, что по степени убывания токсичности препараты меди можно расположить в следующем порядке: сульфат меди, глюконат меди, оксо-сульфат меди, Cu - пептидат, Cu-EDTA хелат, Cu - аминоксид меди, гидроксид меди, оксид меди, оксихлорид меди [145].

Роль антибиотиков в защите растений от бактериального ожога. В 1950-х для борьбы с бактериальным ожогом стали применять антибиотики. В настоящее время в защите растений используются следующие антибиотики: стрептомицин, окситетрациклин, оксолиновая кислота, казугамицин и гентамицин [212]. Наиболее эффективен в борьбе с бактериальным ожогом стрептомицин [176]. Показана важность аминоксидного антибиотика казугамицина как альтернативы стрептомицину в борьбе с бактериальным ожогом [159].

Считается, что основной недостаток применения антибиотиков состоит в том, что у бактерий быстро развивается устойчивость к ним, а сами антибиотики часто оказываются в организме человека и животных при употреблении в пищу обработанных ими продуктов растениеводства [69, 70, 90].

В то же время результаты некоторых исследований опровергают мнение о широком распространении форм патогенов, устойчивых к антибиотикам. По данным Stockwell V. [212], антибиотики активны на поверхности растений меньше недели, а затем быстро инактивируются и смываются в почву. Через месяц после применения антибиотиков бактериальные популяции в саду не отличаются от популяций бактерий, не обработанных антибиотиками. Более того, поскольку стрептомицин является естественным компонентом почвы, так как продуцируется почвенными актиномицетами, обработка растений этим антибиотиком не изменяет бактериальный состав почв. Было установлено, что за три года применения стрептомицина для защиты яблоневого сада от бактериального ожога численность и разнообразие основных бактериальных таксонов почв не изменились. При этом статистически достоверное увеличение генов резистентности было случайное, непоследовательное и было неодинаковым за время проведения обработок. Таким образом, применение стрептомицина или тетрациклина в этих садах не приводило к увеличению у бактерий генов устойчивости к указанным антибиотикам [227]. Однако, чтобы уменьшить частоту возникновения штаммов бактерий устойчивых к антибиотикам, их используют только при высоком риске поражения бактериальным ожогом [126].

Биологическая борьба с бактериальным ожогом. В качестве альтернативы антибиотикам для борьбы с бактериальным ожогом плодовых рассматриваются бактерии, грибы, вирусы, а также различные естественные бактерициды, которые продуцируют эти организмы. Кроме того, предлагается использовать фитоалексины растений.

Показано, что бактерии *Pantoea agglomerans*, штамм E325, могут подавлять развитие бактериального ожога на груше и яблоне [190]. Изучено действие антибиотиков пантоцинов, которые выделяет бактерия *Pantoea agglomerans*, штамм EN318 [237]. Секвенирован геном коммерчески доступного биоагента *Pantoea vagans*, штамм C9-1 [210]. На основе бактерий *Pseudomonas fluorescens* разработан и зарегистрирован препарат Blight Van A506.

Эффективность агентов биологического контроля в подавлении бактериального ожога, как и биоагентов против других заболеваний, во многом зависит от условий окружающей среды. Так, в благоприятных условиях многие штаммы агентов биозащиты успешно колонизируют грушу, яблоню и другие растения-хозяева, вытесняя *E. amylovora* из мест обитания [124, 234]. Однако антагонисты, эффективные *in vitro*, могут недостаточно

успешно поддерживать порог популяции, необходимый для биозащиты в естественных условиях из-за сложностей в колонизации или выживания в филлосфере. Показано, что эффективность бактерии *Pseudomonas fluorescens* EPS62e зависит от ее успешной колонизации поверхности растений после обработки. Было установлено, что на цветках плодовых условия для развития клеток оптимальны, тогда как на поверхности листьев размер популяции этого агента резко снижается [187]. При изучении динамики численности популяции *Pseudomonas fluorescens*, штамм A506, было установлено, что размер популяции бактерий-антагонистов уменьшался с увеличением возраста цветков. С увеличением интервала между обработками размер популяции также уменьшался. При этом рост популяции *Pseudomonas fluorescens* A506 сопровождался значительным уменьшением размера популяции *E. amylovora* и ослаблением симптомов проявления бактериального ожога [148]. Установлено, что бактерии-антагонисты *Pseudomonas fluorescens*, штамм A506 и *Pantoea agglomerans* C9-1 более чувствительны к повышенной концентрации сахара в нектаре, чем бактерии *E. amylovora* [188].

Изучена также эффективность *Pseudomonas graminis* 49M против ожога на цветках яблони сорта Айдаред в теплице. Исследованные бактерии показали эффективность подавления роста возбудителя бактериального ожога, сходную с эффективностью уже известных препаратов, таких как *Pseudomonas fluorescens*, штамм A506 и BlightBan A506, а Miedzian 50 WP (действующее вещество оксихлорид меди) и Aliette 80 WG (фоцетил A1) были менее эффективны, чем 49M. В то же время, при росте на искусственных питательных средах штамм 49M ингибировал рост бактерий *E. amylovora* Ea659 только на среде Кинга Б, а на питательных средах NAS и LB рост патогена антагонистом не угнетался [166].

При изучении распространения препарата на основе бактерий *Bacillus subtilis* BD170 в яблоневом саду было установлено, что прямое опрыскивание приводит к успешной первичной колонизации пестиков цветков, раскрывшихся на момент опрыскивания. Была отмечена и вторичная колонизация нераспустившихся ко времени обработки цветков. Бактерии *Bacillus subtilis* BD170 также были обнаружены в организмах пчел, питавшихся в саду, в их ульях, расположенных в саду и у входов в ульи [74].

Высокую эффективность в условиях сада показало совместное использование бактерий-антагонистов с серной известью (полисульфид кальция), которая применяется для уменьшения плодовой нагрузки на растения [125]. Были получены положительные результаты при применении лиофилизированных бактерий *Pantoea vagans*, штамм C9-1 с последующей обработкой растительным биорегулятором прогексадионом кальция (ProCa, Regalis, BASF) при борьбе с ожогом цветков груши в Турции [180]. В то же время эффективность совместного применения биопрепарата BlightBan C9-1 (или Bloom time) с

стимулятором защитной реакции растения (Actigard) в борьбе с ожогом цветов на стадии розового бутона в яблоневом саду была ниже, чем при использовании этих препаратов по отдельности, когда наблюдался защитный эффект, близкий к тому, который был при обработке стрептомицином [184].

В целом, опыты с использованием бактерий - антагонистов свидетельствуют о том, что они могут распространяться в саду насекомыми, и бывают эффективны в течение короткого периода цветения при обработках с интервалами 7 и 10 дней.

Как один из способов борьбы с бактериальным ожогом, рассматривалась возможность использования авирулентных изолятов *E. amylovora*. В опытах на сеянцах яблони было показано, что защитный эффект во многом зависит от количественного соотношения вирулентных и авирулентных штаммов *E. amylovora* в тканях растений, и от патогенности вирулентных штаммов *E. amylovora* [218].

Изучалась возможность использования грибов дейтеромицетов *Aureobasidium pullulans* (de Vary) Arnaud для борьбы с бактериальным ожогом [150]. Препарат, «Blossom Protect», разработанный на основе этих грибов можно использовать в период цветения, когда риск заражения высокий [203]. В полевых испытаниях препараты «Blossom Protect» и «ЛМА» (алюмокалиевые квасцы) показали эффективность подавления бактериального ожога, близкую к стрептомицину [100, 140].

Другие методы борьбы с бактериальным ожогом. В качестве альтернативных методов предлагается уменьшить чувствительность растений-хозяев к патогену после цветения путем применения молекул, усиливающих защитный ответ растений. Зарегистрированы два препарата на основе таких молекул – Vacciplant (ламинарин) и Aliette (фоцетил Al), причем Vacciplant лучше действует на цветках, а Aliette уменьшает количество выделяемого экссудата и эффективен против форм ожога на цветках, побегах и плодах [203].

Для борьбы с бактериальным ожогом предлагается также использовать антимикробные пептиды, которые продуцируют растения и животные в качестве первого защитного барьера, а микроорганизмы – как фактор конкуренции [48]. Изучено воздействие на *E. amylovora* протеинов, выделенных из злаков (пуротионинов и пуроиндолинов), насекомых (кекропинов), животных (лизоцим белка куриного яйца), и микроорганизмов (лизоцим бактериофага T4). Установлено, что наибольшей бактерицидной активностью обладали кекропины. Следующим по эффективности был лизоцим фага T4. Также наблюдался синергетический эффект действия кекропина и лизоцима белка куриного яйца. Кекропины при этом не проявляли токсичности к клеткам груши, однако межклеточная жидкость листьев груши вызывала потерю бактерицидной активности и разрушение

кекропинов [170]. Были обнаружены две не входящие в состав белков аминокислоты, которые в несколько раз активнее против диких и стрептомицин устойчивых штаммов *E. amylovora* [86].

Изучалось бактерицидное действие растительных экстрактов в борьбе с бактериальным ожогом. В лабораторных условиях наиболее эффективными против стрептомицин устойчивых штаммов *E. amylovora* были экстракты из чеснока, марены красильной (*Rubia tinctorum* L) и гармалы обыкновенной (*Peganum harmala* L.). В то же время эти экстракты были менее эффективны против штаммов бактерий чувствительных к стрептомицину [217].

Обнаружение у *E. amylovora* сигнальных молекул механизма *quorum sensing*, оказывающих влияние на экспрессию вирулентных факторов, представляет собой еще один из аспектов разработки стратегии подавления развития бактериального ожога путем использования факторов, разрушающих эту сигнальную систему. Тем более, что у многих организмов – как у эукариотов, так и у прокариотов – обнаружен механизм «*quorum quenching*», или «гашение общности», направленный на блокирование механизма *quorum sensing*, посредством разрушения молекул аутоиндукторов различными ферментами (например, АГЛ-лактоназами) или другими ингибиторами механизма *quorum sensing*, такими как галогенизированные фураноны, триклозан, и клозантел [88]. Существенную роль в нарушении работы механизма *quorum sensing* могут играть и бактериофаги, которые активно изучаются в последние десятилетия.

Как правило, в защите садов от бактериального ожога плодовых применяется сочетание описанных средств борьбы с патогеном [126]. При сравнении эффективности подавления бактериального ожога в полевых условиях в яблоневом саду Иллинойса препаратов окситетрациклина (Mycoshield), казугамицина (Kasumin 2L и ARY-4016-06), гидроксида меди (Kocide-3000 41.6DF), *Bacillus subtilis* (Serenade Max, QST713) и *Pseudomonas fluorescens* (Blight Ban A506) было установлено, что бактерии *E. amylovora* подавлял только казугамицин (Kasumin 2L и ARY-4016-06) [128].

На основании анализа литературных данных была рассчитана наименьшая существенная разница средней эффективности различных средств борьбы с бактериальным ожогом плодовых. Авторы показали, что средняя эффективность антибиотиков составила от 59,7 до 61,7%, в том числе стрептомицина – 68,6%. Совместные обработки стрептомицином и препаратами на основе *Pantoea agglomerans* приводили к 55% среднего уменьшения заболевания, а совместные обработки стрептомицином и препаратами на основе *Bacillus subtilis* – 53,9%. При обработке растений только препаратами на основе *B. subtilis*, *P. agglomerans* и *Ps. fluorescens* среднее уменьшение заболевания было 31,9, 25,7, и

22,6%, соответственно. Следовательно, достаточно высокая эффективность совместных обработок стрептомицином и бактериями-антагонистами достигалась за счет антибиотика. Наиболее эффективным из индукторов защитной реакции растений был прогексадион кальция – 50,7% защитного эффекта, тогда как остальные индукторы защитной реакции растений давали уменьшение заболевания в пределах 6,1 – 25,8%. Степень защитного эффекта значительно зависела от местности и сорта растений и была меньше, но изменчивее при испытании препаратов в условиях высокой интенсивности заболевания [176].

Таким образом, несмотря на то, что за годы изучения возбудителя бактериального ожога накоплен большой объем сведений о патогене и методах борьбы с ним, площадь садов, пораженных этим заболеванием растет [208]. Предметом внимания бактериологов является изучение причин такого роста, а также разработка мероприятий по уменьшению распространения и вредоносности этого заболевания.

1.3. Бактериофаги как средство борьбы с бактериозами

Общие сведения о бактериофагах. Бактериофаги (фаги) образуют группу специфических бактериальных вирусов и, согласно результатам последних исследований, являются наиболее распространенными живыми существами на планете [7, 75, 231].

Считается, что впервые гипотеза о фильтрующемся вирусе, поражающем бактерии, была выдвинута в 1915 г. Туортом Ф. (Frederick Twort), хотя еще в 1898 году Гамалея Н. Ф. наблюдал перевиваемый лизис сибиреязвенной палочки. Туорт считал, что бактериофаги представляют собой литические ферменты [7]. Независимо от Туорта, в 1917 году Феликс д'Эррель (Felix d'Herelle) сообщил об открытии частиц, убивающих бактерии и назвал их «бактериофаги». В 1921 г. д'Эррель опубликовал классический труд по бактериофагам, где рассматривал вирусную природу фагов [14].

По современным представлениям, фаговая частица представляет собой геном, записанный в виде ДНК или РНК, который упакован в белковый капсид, иногда покрытый фосфолипидной оболочкой и часто снабженный отростком (хвостом). Отросток бактериофагов – это полая трубка, окруженная чехлом. У некоторых фагов чехол способен сокращаться. На конце отростка есть базальная пластинка, которая контролирует узнавание клетки хозяина, прикрепление к ней вируса, сокращение хвостового чехла и инъекцию вирусной нуклеиновой кислоты в клетку [21, 23]. Встречаются бактериофаги, у которых хвост отсутствует. Такие фаговые частицы могут быть округлой или нитевидной формы.

По результату инфекции бывают вирулентные (истинные) фаги, умеренные фаги и фаги с непрерывным циклом развития.

Под действием вирулентных фагов происходит лизис клетки бактерии-хозяина с последующим освобождением потомства фага. Описан механизм инфицирования бактериальной клетки вирулентным (истинным) бактериофагом: в строго определенных местах на внешней мембране бактерии фаг прикрепляется отростком к бактериальной клетке и, выделяя комплекс ферментов, растворяет клеточную стенку. Затем содержимое головки фага через каналец отростка переходит внутрь клетки. Мелкие, сферические фаги попадают в бактерии без участия отростка. Под влиянием нуклеиновой кислоты фага останавливается синтез бактериальных белков, ДНК и РНК, и начинается синтез нуклеиновой кислоты и белков фага. Часть этих белков — ферменты, другая часть образует оболочку зрелой частицы бактериофага. При заражении вирулентным фагом, как правило, выживают только фагоустойчивые мутанты.

Умеренные фаги приводят бактериальную клетку в лизогенное состояние, при котором геном фага находится в виде профага. Профаг большинства умеренных фагов встроен в хромосому бактерии или другой репликон или находится в бактериальной клетке в виде плазмиды. В некоторых случаях на долю профага приходится от 10 до 20% бактериальной хромосомы [79]. При этом все фаговые гены, необходимые для литического пути развития репрессированы белком-репрессором. Когда концентрация репрессора падает ниже определенного уровня, начинается транскрипция генов, продукты которых используются для лизиса, образуется потомство фага, и клетка разрушается. Таким образом, зараженная умеренным фагом бактериальная клетка может развиваться как по литическому (клетка погибает и освобождает потомство фага), так и по умеренному пути. У умеренных фагов отмечены вирулентные мутанты.

При заражении клетки-хозяина фагами с непрерывным циклом развития, в ней постоянно образуются и выделяются фаги. Фаг освобождается через специфические поры в клетке, причем в ходе его освобождения происходит его созревание — нуклеиновая кислота покрывается белковой оболочкой [7, 21, 23, 63, 160].

Кроме перечисленных трех групп бактериофагов известны фаги, вступающие в псевдолизогенные отношения с клеткой, при которых наблюдается временное сосуществование вирулентных бактериофагов и чувствительных к ним бактерий.

К бактериофагам можно применить классическую биологическую теорию оптимального фуражирования, согласно которой выбор пищи животными зависит от времени, затраченного на поиск пищи и времени, затраченного на обработку пищи. Показано, что фаги с коротким латентным периодом и маленьким урожаем вытесняют фаги с длинным латентным периодом и большим урожаем, а большая плотность бактерий приводит к отбору фагов с более коротким латентным периодом [40, 46]. В то же время

невысокая численность бактериального хозяина, который обеспечивает репродукцию отдельных фагов в природе, обуславливает необходимость включения механизмов, которые обеспечивают смену литической активности бактериофагов. В связи с этим, наряду с сохранением старых штаммов, в популяции фагов постоянно образуются новые рекомбинанты [39].

Классификация бактериофагов. Современная классификация бактериофагов основана на морфологии вириона (наличие или отсутствие хвоста, структура хвоста, наличие или отсутствие у белкового капсида фосфолипидной оболочки) и по нуклеиновой кислоте, в виде которой записан геном фага. В таблице 1.2 приведена классификация фаговых частиц, принятая в настоящее время Международным Комитетом по Классификации Вирусов – International Committee on Taxonomy of Viruses [122].

Таблица 1.2. Классификация фаговых частиц, принятая ICTV, 2013

Таксономическая единица	Отличительные признаки
Порядок <i>Caudovirales</i>	
Семейство	
<i>Myoviridae</i>	без оболочки, с линейной двухцепочечной ДНК, с длинным сокращающимся хвостом
<i>Siphoviridae</i>	без оболочки, с линейной двухцепочечной ДНК, с длинным несокращающимся хвостом
<i>Podoviridae</i>	без оболочки, с линейной двухцепочечной ДНК, с коротким хвостом
Порядок <i>Ligamenvirales</i>	
Семейство	
<i>Lipothrixviridae</i>	покрыты оболочкой, палочковидные с линейной двухцепочечной ДНК
<i>Rudiviridae</i>	без оболочки, палочковидные с линейной двухцепочечной ДНК

Неклассифицированные фаги	
Семейство	
<i>Ampullaviridae</i>	покрыты оболочкой, с линейной двухцепочечной ДНК, бутылковидные
<i>Globuloviridae</i>	покрыты оболочкой, с линейной двухцепочечной ДНК, изометрические
<i>Plasmaviridae</i>	покрыты оболочкой, с кольцевой двухцепочечной ДНК, плейоморфные
<i>Cystoviridae</i>	покрыты оболочкой, с сегментированной двухцепочечной РНК, сферические
<i>Bicaudaviridae</i>	без оболочки, с кольцевой двухцепочечной ДНК, лимоновидные
<i>Clavaviridae</i>	без оболочки, с кольцевой двухцепочечной ДНК, палочковидные
<i>Corticoviridae</i>	без оболочки, с кольцевой двухцепочечной ДНК, изометрические
<i>Fuselloviridae</i>	без оболочки, с кольцевой двухцепочечной ДНК, лимоновидные
<i>Guttavirus</i>	без оболочки, с кольцевой двухцепочечной ДНК, яйцевидные
<i>Inoviridae</i>	без оболочки, с кольцевой одноцепочечной ДНК, нитевидные
<i>Microviridae</i>	без оболочки, с кольцевой одноцепочечной ДНК, изометрические
<i>Tectiviridae</i>	без оболочки, с линейной двухцепочечной ДНК, изометрические
<i>Leviviridae</i>	без оболочки, с линейной одноцепочечной РНК, изометрические

Однако, по мнению некоторых специалистов, данная классификация недостаточно точно отражает особенности бактериофагов. Большинство исследователей считают, что классификация фагов должна, прежде всего, отражать данные о строении их геномов. Предложено классифицировать фаги, на основе «протеомного дерева фагов» (*phage proteomic tree*), созданном с учетом взаимосвязей между фаговыми протеомами [196].

Lawrence J.G., и др, в 2002 предложили основные принципы разработки любых вирусных таксономических систем [149], а Proux C., van Sinderen D., (2002) – схему классификации вирусов, основанную на сравнительной геномике структурных генных модулей [186]. В 2012 году был разработан Набор инструментов для классификации фагов (Phage Classification Tool Set – PHACTS), который на основании изучения протеома позволяет различать вирулентные и умеренные фаги с точностью до 99% [161]. Однако, с точки зрения Kurovic M. и др., (2011) недостаток всех предлагаемых систем классификации, состоит в том, что, чем точнее они отражают филогенетическую сложность вирусов бактерий, тем более сложными становятся сами [139].

Практическое использование бактериофагов. Долгое время бактериофаги использовались, главным образом, в качестве инструмента молекулярной биологии. Именно опыты с применением бактериофага T2, которые провели в 1952 году Альфред Херши и Марта Коулз Чейз, позволили доказать, что ДНК является основным носителем наследственной информации [38].

Вместе с тем, почти сразу после открытия бактериофагов стали проводиться исследования, посвященные изучению возможности их использования в борьбе с бактериальными заболеваниями. В медицине метод лечения бактериальной инфекции посредством приема внутрь специфического поливалентного фага или его местной аппликации получил название фаготерапии [37]. Так, в 1921 году Brunoghe & Maisin сообщили об успешном применении фагов в борьбе с инфекциями, вызываемыми стафилококком и *Bacillus anthracis*. В 1922 году фаги были использованы для борьбы с брюшным тифом и бактериальной дизентерией, а также для локализации вспышки холеры в Индии [127]. В настоящее время активно ведутся исследования в области использования бактериофагов при лечении инфекций, вызванных, в частности, синегнойной палочкой *Pseudomonas aeruginosa* [10].

В защите растений бактериофаги фитопатогенных бактерий первоначально рассматривались лишь как диагностическое средство. Они использовались для идентификации и дифференциации изолятов *Erwinia amylovora*, выделенных из растений семейства *Rosaceae* [59], а также для определения взаимодействия фаг-бактерия [116].

Несмотря на то, что среди части фитопатологов утвердилось мнение, что, в целом, фаги нельзя считать эффективным средством в борьбе с болезнями растений [111, 178], работы по применению фаготерапии в защите растений продолжали проводиться.

При изучении фагов *in vitro* было показано, что они ингибируют рост таких бактерий как *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*, *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*. В полевых условиях фаги *Xanthomonas malvacearum* являлись

фактором, ограничивающим развитие гоммоза хлопчатника, а при обработке фагами семян кукурузы, зараженных *Pantoea stewartii* (Smith, 1898) интенсивность развития болезни уменьшалась с 18% до 1,4% [127]. В 1967 Stonier Т. и др. сообщили, что на томатах фаги подавляли развитие опухолей, вызванных высоковирулентным штаммом *Agrobacterim tumefaciens*, однако при этом уничтожить уже существующую опухоль с помощью фагов не удавалось [213]. Было показано, что в борьбе с *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* применение фагов до заражения уменьшало интенсивность развития заболевания на 42% по сравнению с необработанным контролем, тогда как применение фагов после инфицирования растений бактерией было неэффективным [82]. Предварительная обработка *Nicotiana* L. фагами и авирулентными штаммами *Pseudomonas solanacearum* M4S защищала растения от бактериального увядания [216]. Значительное уменьшение проявления пятнистости листьев и плодов персика, вызванное *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*, наблюдали при обработке фагами деревьев в саду [199]. В 2000 году были получены положительные результаты применения фаготерапии в борьбе с *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* на томатах [98]. В последние годы хорошие результаты показали испытания бактериофагов в борьбе с *Xanthomonas malvacearum* на хлопке [20], *Ralstonia solanacearum* – на томатах [102], *Dickeya solani* - на картофеле [42] и *Erwinia amylovora* – на плодовых [36, 70, 163].

Преимущества и недостатки фаготерапии. Возобновление интереса к фаготерапии, которое наблюдается в настоящее время, вызвано быстрым развитием и высокой скоростью распространения устойчивости к антибиотикам и бактерицидам, обусловленной наличием мигрирующих генетических элементов у бактерий; большой скоростью изменчивости самих патогенов; высокой скоростью их размножения при благоприятных условиях, а также отсутствием эффективных систем защиты от бактериальных заболеваний, основанных на применении химических и других альтернативных средств.

Существует ряд проблем, которые могут препятствовать широкому применению фаготерапии в борьбе с патогенами растений. Наибольшую опасность для бактериофагов представляет УФ излучение [123, 127]. На активность фагов и, следовательно, их эффективность как агентов биологической борьбы, существенное влияние оказывает pH среды. Так, установлено, что фаги грамположительной бактерии *Listeria monocytogenes* на поверхности кусочков яблок с pH 4,37 были нестабильны, в то время как на поверхности дыни, где pH 5,77, фаги успешно лизировали патоген [146]. Показано, что температура влияет как на выживаемость фагов [123], так и на их способность лизировать клетки бактерий. Обнаружено, что некоторые растительные экстракты разрушают фаги *in vitro*

[84]. Кроме того, отмечается, что уменьшение числа вирулентных фагов на поверхности и в тканях растений часто вызвано недостаточным количеством бактерий-хозяев.

В свою очередь, бактериофаги, как мигрирующие генетические элементы, активно влияют на процессы изменчивости микро и макроорганизмов. Поэтому некоторые свойства фагов, как генетических элементов, могут представлять существенную опасность (при использовании) в фаготерапии:

- фаги способны к общей и специфической трансдукции. Трансдуцироваться могут, например, устойчивость к антибиотикам и к другим бактериофагам. При этом использование фагов с большими геномами может представлять особую опасность, так как они способны переносить большие участки бактериальных хромосом, что увеличивает вероятность захвата нескольких патогенных модулей бактерий. По мнению Крылова и Grampton, использование в фаготерапии вирулентных общетрансдуцирующих фагов может вести к распространению островков патогенности среди новых штаммов бактерий [21, 99];

- многие фаги способны к изменению различных свойств бактериального хозяина (фаговой конверсии). Так, синтез дифтерийного, скарлатинозного токсина и энтеротоксинов в лизогенных клетках происходит под контролем генов, привнесенных профагом, а бактериофаг холерного вибриона CTXphi не только кодирует холерный токсин и большой остров патогенности, но и способен захватывать XerC/D фермент бактериальной клетки для интеграции своего генома в ДНК бактерии, не кодируя собственную рекомбиназу [119, 160]. Именно по этой причине в фаготерапии исключается использование умеренных фагов дикого типа [21, 99];

- наличие фагов-транспозонов, которые, вследствие особенностей своего развития, встраиваются в разные участки бактериального генома, может приводить к возникновению устойчивости к некоторым антибиотикам и изменять другие свойства бактерий из-за перестроек бактериальных геномов [21].

Широкое применение фаготерапии может привести к возникновению штаммов бактерий, устойчивых к бактериофагам. Часто фаги присоединяются к поверхности бактерий в месте прикрепления жгутиков. Поэтому одним из механизмов устойчивости бактерий к фагам является уменьшение количества жгутиков, как потенциальных мест прикрепления бактериофагов. Отсутствие жгутиков, в свою очередь, приводит к уменьшению подвижности бактерий и, следовательно, к уменьшению конкурентоспособности. В ряде лабораторных экспериментов показано, что фаги могут ускорить эволюцию бактерий путем интенсивной селекции фагоустойчивых бактерий. Установлено, что устойчивость к бактериофагам отрицательно коррелирует с некоторыми жизненно важными характеристиками бактерий, такими как интенсивность роста и

подвижность, которые имеют большое значение для патогенности бактерий [101]. Таким образом, устойчивость бактерий к бактериофагам, как правило, связана с существенными потерями, в том числе, с увеличением количества вредных мутаций и уменьшением конкурентной способности.

В то же время, результаты изучения взаимодействия эрвинии подобных бактерий и псевдомонад и симпатрических бактериофагов в филлосфере конского каштана не подтвердили взаимосвязь между развитием устойчивости к бактериофагам и подвижностью бактерий в природных популяциях. При этом была обнаружена неожиданная положительная связь между устойчивостью фагов и подвижностью у *Pseudomonas* в филлосфере [138].

Пути преодоления проблем фаготерапии. Проблемы фаготерапии связаны как с воздействием на бактериофаги различных абиотических и биотических факторов, так и с воздействием самих бактериофагов на бактерии-хозяева и на макроорганизмы, на которых паразитируют патогенные бактерии. Поэтому способы преодоления проблем, возникающих при использовании бактериофагов в борьбе с бактериальными патогенами, разрабатываются именно в этих двух направлениях.

Так, для устранения или нейтрализации негативного влияния абиотических и биотических факторов предлагается проводить обработки препаратами на основе бактериофагов, при минимальном воздействии на них неблагоприятных факторов окружающей среды: при невысокой интенсивности УФ излучения и оптимальном рН. Для каждой из систем «хозяин – патоген – бактериофаг» эти показатели индивидуальны.

Для предотвращения высыхания и улучшения адгезивных свойств фаголизатов был предложен раствор на основе молочной сыворотки с добавлением сахарозы. Однако эти компоненты усиливали рост патогена, поэтому для приготовления защитных растворов рекомендуется использовать биологически инертные вещества [127]. Для продления срока действия фагов предлагается в качестве их носителей использовать непатогенные для растений штаммы бактерий, бактерии-антагонисты патогенов или авирулентные штаммы патогенов. В качестве средства для увеличения срока активности вирусов рекомендуется использовать антиоксиданты [120, 121]. При обработке патогенных бактерий следует использовать фаги, выделенные из привычных мест обитания этих бактерий. То есть почвообитающие бактерии обрабатывать фагами, выделенными из почвы, а бактерии, поражающие надземные части растений, соответственно, фагами, выделенными из филлосферы [127]. Это обусловлено тем, что фаги, инфицирующие бактерии, которые обитают в надземных частях растений, приспособлены к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды, характерных для данных условий. Например, они более

устойчивы к УФ излучению, чем фаги, выделенные из почвы. В то же время, почвообитающие бактериофаги более устойчивы к изменению pH среды. Необходимо приурочить время применения фагов в полевых условиях к моменту, наиболее благоприятному для развития патогена, так как, являясь строго специфичными облигатными паразитами, фаги могут сравнительно быстро уничтожить популяцию данного патогена или довести ее до уровня, при котором растение способно противостоять инфекции. Желательно применять фаги, активные одновременно против вирулентных и авирулентных штаммов патогена, так как авирулентные штаммы патогена могут служить носителями фагов при производстве фаговых препаратов и на растениях-хозяевах, потенциальных объектах поражения вирулентными бактериями.

Считается, что во избежание возникновения устойчивости бактерий-хозяев, целесообразнее использовать в борьбе с бактериозами не один, а смесь фагов, поскольку устойчивость к нескольким фагам вырабатывается медленнее. Но в ряде экспериментов показано, что устойчивость к нескольким фагам, скорее всего, возникает так же, как, и устойчивость к одному фагу и неявно связана с увеличением общей устойчивости, а всего лишь требует от бактерий более высоких энергетических затрат [136].

Особое внимание следует уделить чувствительности фагов к бактерицидам, в частности, к меди. Показано, что большинство вирусов в той или иной степени чувствительны к высоким концентрациям ионов меди. При этом важную роль в усилении инактивирующего воздействия меди на вирусы играет вода. Установлено, что фаги, содержащие двухцепочечную молекулу ДНК и не содержащие липиды, более устойчивы к воздействию меди. Фаги, покрытые фосфолипидной оболочкой, кроме PRD1, высокочувствительны к меди. В меньшей степени чувствительны к меди, фаги, содержащие одноцепочечную молекулу РНК или ДНК [147].

Для уменьшения нежелательного воздействия бактериофагов на бактерии-хозяева и макроорганизмы, на которых паразитируют патогенные бактерии, разрабатывается комплекс мероприятий. При этом обязательным условием является установление видовой принадлежности и размера генома бактериофагов путем секвенирования его генома [99]. Это позволяет убедиться в том, что в геноме бактериофага отсутствуют гены, ответственные за патогенность бактерий и/или гены, кодирующие белки-аллергены [110]. Поскольку умеренные фаги способны переносить гены вирулентности бактерий, следует использовать только вирулентные фаги и фаги, у которых нет способности к трансдукции и к псевдолизогенности [21, 110]. Кроме того, бактериофаги должны обладать широким спектром литического действия, инфицировать несколько видов и/или родов целевых бактерий и быть способными размножаться на непатогенном хозяине. Для преодоления

устойчивости бактерий к фагам предлагается использовать фаги-мутанты, так, чтобы они не подавляли развитие друг друга и были способны к перекрестному лизису бактериальных мутантов [21, 110, 127].

С точки зрения технологии производства терапевтических препаратов на основе бактериофагов, очень важно, чтобы они были устойчивы к процедурам очистки от бактерий, чтобы их можно было достаточно просто получать в высоком титре и в течение длительного времени хранить и использовать без ущерба для их литической активности [23]. Очевидно, что использование препаратов на основе фагов должно быть без побочных эффектов, а продукты, полученные с применением фагов, должны иметь сертификат безопасности [110].

Преимущества фаготерапии. Одно из главных достоинств фаготерапии состоит в том, что бактериофаги являются естественными компонентами экологических систем, так как везде, где есть бактерии, присутствуют и их бактериофаги [21, 99, 127]. Важным свойством фагов является их способность самовоспроизводиться [110, 114, 127]. Кроме того, большинство фагов – высокоспецифичные организмы, которые поражают только целевые бактерии и не наносят ущерб другим, потенциально полезным микроорганизмам. Это дает возможность использовать их с другими бактериальными антагонистами для усиления борьбы с патогенами.

В ходе эволюции у бактериофагов выработались эффективные механизмы инфицирования бактериальных клеток. Так, бактериофаги способны продуцировать протеины, которые принимают участие в различных этапах лизиса бактерий хозяев. Протеины бактериофагов можно разделить на две основные группы: 1) разрушающие клеточные покровы (пептидогликан, клеточную мембрану, клеточную =бактериальную капсулу) и 2) нарушающие репликацию бактериальной ДНК, транскрипцию, синтез белков и деление клетки [89, 116]. В фаготерапии в настоящее время рассматривается возможность использования протеинов из первой группы.

Полисахаридный слой, которым окружена бактерия, фаги преодолевают при помощи протеинов, обладающих деполимеризационной активностью. По каталитической активности деполимеразы фагов можно разделить на две группы: гидролазы (полисахаразы) и полисахарид лиазы. Деполимеразы могут находиться в двух формах: в виде свободно диффундирующих белков или как компоненты фаговых частиц. Наиболее изученный тип ЭПС деполимераз – эндосиалидаза (КФ 3.2.1.129 гликозил гидролаза).

Пептидогликановую оболочку при проникновении фагов внутрь бактериальной клетки разрушают пептидогликан-лизирующие ферменты (ПЛФ). А при высвобождении потомства фагов из бактериальной клетки используются мембрано-проникающие

регуляторные белки лизиса (РБЛ). По способу связывания и расщепления субстрата ПЛФ бактериофагов подразделяются на: 1) лизоцимподобные мурамидазы КФ 3.2.1.17; 2) N – ацетилмурамоил-L-аланин-амидазы КФ 3.5.1.28; 3) пептидазы КФ 3.4.17 а также эстеразы КФ 3.1.1.2 [24]. ПЛФ бактериофагов способны лизировать только те виды или подвиды бактерий, против которых направлены фаги – продуценты ПЛФ, т. е. являются высокоспецифичными. Так, установлено, что бактериолитическая активность ПЛФ бактериофагов SMP1 и CN77, которые поражают *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* и *C. michiganensis* ssp. *nebraskensis*, соответственно, ограничивалась только этими подвидами *C. michiganensis* и не влияла на другие бактерии, даже близкородственные *Clavibacter*. Это значит, что ПЛФ бактериофагов SMP1 и CN77 можно использовать в качестве агентов биозащиты томатов от бактериального рака без воздействия на другие почвенные бактерии [235]. Таким образом, ПЛФ продуцируемые бактериофагами, могут быть важным антимикробным средством в условиях увеличивающейся устойчивости патогенов к антибиотикам [96, 99].

Нетоксичность фагов для эукариотов позволяет применять их там, где противопоказаны химические методы борьбы с бактериями.

Препараты на основе бактериофагов достаточно просто производить без серьезных экономических затрат. Их можно долго хранить и применять с использованием стандартного оборудования [21, 99, 127].

1.4. Бактериофаги *E. amylovora*

Изучение фагов, которые инфицируют бактерии *E. amylovora*, началось почти сразу после открытия бактериофагов. В 1925 Coons G.H. и Kotila J. E. выделили литическое начало (фаг) из почвы, речной воды и больных тканей растений с симптомами поражения бактериальным ожогом, а в 1947 Thomas R. C. показал, что бактериофаги можно использовать для идентификации и дифференциации изолятов *E. amylovora*, выделенных из разных видов растений: груши, яблони, рябины, кизильника и боярышника [127]. С тех пор был опубликован целый ряд работ по использованию бактериофагов как средства идентификации вирулентных изолятов *E. amylovora*, а также для установления родственных связей между изолятами *E. amylovora* и желтой сапрофитной бактерией (*Pantoea agglomerans* = *Erwinia herbicola*), которая обычно сопутствует *E. amylovora* и выделяется вместе с *E. amylovora* из тканей, пораженных бактериальным ожогом [50, 62, 109]. В 1960 Billing E. применил фаги для установления родства между типичными вирулентными и атипичными (без капсул) штаммами *E. amylovora* [62]. В 1977 Ritchie D.F. и Klos E. J обнаружили в надземных частях яблонь, пораженных бактериальным ожогом, популяции бактериофагов *E. amylovora* с высоким титром (более чем 10^6 БОЕ на 1г ткани).

Авторы отметили, что бактериофаги легко выделялись из растений и были найдены во всех тканях, где обнаруживались бактерии *E. amylovora*, за исключением листьев без симптомов поражения бактериальным ожогом [194].

В последнее десятилетие проходит активный поиск и изучение бактериофагов. В 2001г. в яблоневых садах Мичигана были идентифицированы пять штаммов бактериофагов *E. amylovora* [202]. В 2003г. в Канаде из плодовых растений, пораженных бактериальным ожогом, а также из почвы было выделено 50 изолятов бактериофагов, 42 из которых выдержали процесс выделения и очистки. При этом только пять фагов были выделены из кроны растений [108]. В 2011г. из груш и яблонь в Британской Колумбии было выделено 19 фагов, активных против *E. amylovora* [108]. В Швейцарии выделены и охарактеризованы 24 новых бактериофага, вирулентные к бактериям *E. amylovora* [69].

Установлено, что бактерии *E. amylovora* инфицируют хвостатые прокариотические вирусы из трех основных семейств *Myoviridae*, *Siphoviridae* и *Podoviridae* [69, 70, 108, 195, 202], Представители этих семейств составляют 24,8%, 57,3%, и 14,2% от всех бактериальных вирусов, соответственно [41].

Механизм действия бактериофагов *E. amylovora*. Бактериофаги, лизирующие бактерии *E. amylovora*, используют различные способы развития в бактериях (рисунок 1.1).

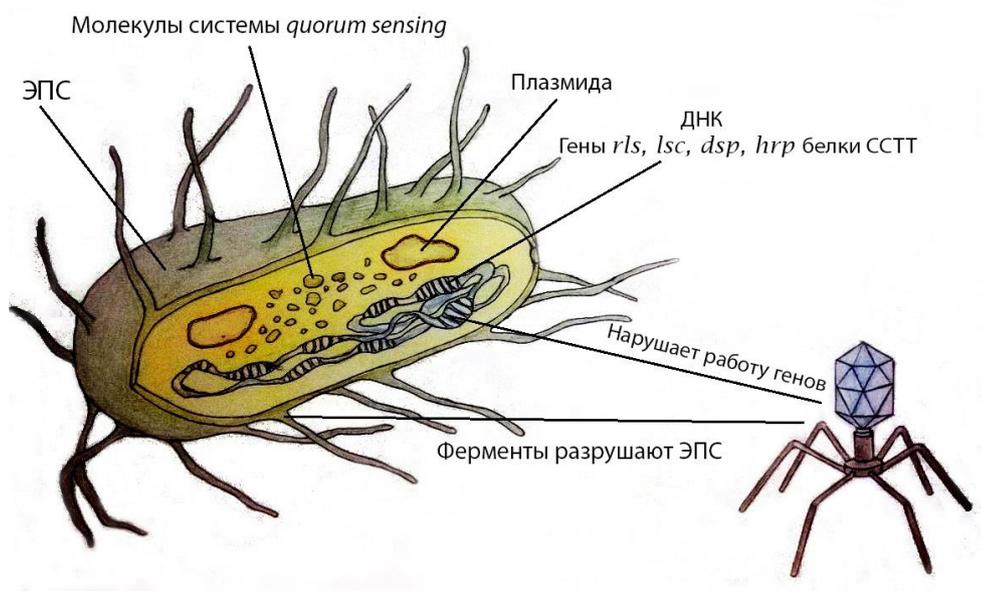


Рис. 1.1. Влияние бактериофагов на основные факторы вирулентности *E. amylovora* (Самойлова А., 2016).

Для проникновения в клетку бактерии, фаги продуцируют ферменты, разрушающие полисахаридные капсулы, покрывающие бактерии. Из бактерий *E. amylovora*, зараженных бактериофагом ERA103, выделили деполимеразу, которая разрушает внеклеточные полисахариды интактных клеток *E. amylovora* [225]. Позже из генома бактериофага ERA 103 был выделен участок, кодирующий синтез этого фермента [224]. Ген бактериофага, контролирующий синтез деполимеразы, с помощью векторной плазмиды был помещен в клетки *E. amylovora*. Изучение вирулентных свойств таких клеток, показало, что они вызывают некроз тканей груши, однако характерный симптом поражения бактериальным ожогом – образование экссудата – при этом не наблюдается. Таким образом было показано, что патогенность, то есть способность индуцировать заболевание, отлична от способности вызывать симптомы заболевания [117].

Доказана специфичность пептидогликан лизирующих ферментов (ПЛФ) фагов, инфицирующих бактерии *E. amylovora*. Так, образование экссудата и мягких гнилей, вызванное воздействием *E. amylovora* и *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, соответственно, угнеталось сильнее лизоцимом фага φEa1h, выделенным из бактерий *E. amylovora*, чем лизоцимом фага T4, неспецифичного для бактерий из рода *Erwinia* [200].

Экзополисахаридные капсулы бактерий *E. amylovora* определяют круг хозяев, поражаемых фагами [172]. Фаги из семейства *Myoviridae* приспособлены к хозяевам, которые вырабатывают небольшое количество ЭПС, и для эффективного инфицирования им необходимо наличие левана, в то время как фаги из семейства *Podoviridae* инфицируют хозяев, которые вырабатывают большое количество ЭПС, а для успешного патогенеза им необходим амиловоран [195]. Так, было показано, что L1 подобные мелкие подовирусы, выделенные из штамма CFBR 1430 *E. amylovora*, были неспособны инфицировать штамм 4/82 *E. amylovora*, вырабатывающий небольшое количество ЭПС [69].

Амиловоран участвует в передвижении бактерий в тканях растений-хозяев [67] и, совместно с леваном, отвечает за формирование биопленок *E. amylovora*. Отсутствие синтеза амиловорана сопровождается уменьшением способности бактерий к клеточной агрегации и прикреплению к субстрату [133]. Штаммы *E. amylovora*, которые неспособны вырабатывать амиловоран являются непатогенными, не могут передвигаться по сосудам растений [55] и быстро погибают после инокуляции растений-хозяев [133]. Таким образом, адаптацию фагов семейства *Podoviridae* к продуцированию амиловорана можно считать эффективной стратегией выживания [195]. В отличие от подовирусов, фаги семейств *Myo-* и *Siphoviridae* не проявляют в культуре ЭПС деполимеразную активность [144], а фаги семейства *Myoviridae* не содержат гены, кодирующие ЭПС деполимеразу [172]. До сих пор

неясен механизм, с помощью которого эти фаги преодолевают ЭПС барьер и инфицируют своих хозяев [195].

Роль бактериофагов в эпидемиологии бактериального ожога. Первым возможную роль бактериофагов в эпидемиологии бактериального ожога отметил Erskine J. M. [92]. Он показал, что фаги, выделенные из почвы, собранной рядом с грушами, пораженными бактериальным ожогом, эффективно лизировали как изоляты желтой сапрофитной бактерии *P. agglomerans*, так и вирулентные штаммы *E. amylovora*.

В настоящее время в крупнейших лабораториях мира проводятся исследования, по выделению бактериофагов и определению их роли в эпидемиологии бактериального ожога плодовых. Изучается и возможность использования фагов для получения трансгенных растений. Так, при переносе гена бактериофага, кодирующего синтез деполимеразы, в геном груши (*Pyrus communis* L.) cv. Passe Crassane, чувствительного к поражению бактериальным ожогом, трансгенные клоны груши были более устойчивы к заражению бактерией *E. amylovora* [156].

В 2001 году Schnabel, E. L. и Jones, A. L. выделили фаг ФЕa116С, который на 95% уменьшал титр жидкой культуры Ea110 при добавлении 1 БОЕ /мл фага на 10 КОЕ /мл бактерии. Эти же авторы показали, что обработка отделенных цветков яблони смесью из 3-х штаммов фагов приводила к снижению интенсивности развития бактериального ожога плодовых на 37% [202]. Изучали действие фагов на бактерии *E. amylovora* на цветках среднеустойчивого сорта яблони 'Freedom' *in vitro*. Было установлено, что обработка фагами Н6 на 90% уменьшала количество реизолируемых бактерий *E. amylovora* на цветках [204].

При изучении фагов, инфицирующих бактерии *E. amylovora* в Британской Колумбии, установлено, что фаги ФЕa1337-26 и ФЕa2345-6 в лабораторных условиях снижали поражение цветков груши на 84% и 96%, соответственно. Кроме того, совместное применение фагов ФЕa2345-6 и Eh21-5 снижало поражение цветков яблони на опытных растениях на 56%, и было близко к действию антибиотика стрептомицина [70]. В серии лабораторных экспериментов, проведенных с фагами, выделенными в Швейцарии, было установлено, что фаги L1, M7, S6 и Y2 могут быть использованы для борьбы с бактериальным ожогом плодовых. При этом подчеркивается, что предпочтительнее использовать смесь фагов [69]. Vogt Y., и др., (2013) считают, что удачной комбинацией для биологической защиты от бактериального ожога может быть совместное использование гидролазы DpoL1, продуцируемой фагом L1, и фага Y2 семейства *Myoviridae*, который поражает широкий круг бактериальных хозяев [68]. В 2014 году Meczker K. и др. в борьбе с бактериальным ожогом успешно применили смесь сиповирусов phiEaH1 и phiEaH2 [163],

а Mazzucchi U. и др. в этом же году зарегистрировали патент на применение бактериофага М9 в борьбе с бактериальным ожогом плодовых в саду [181].

Таким образом, исследования патогенов, их паразитов и хозяев убедительно доказывают, что существование, в данном случае, системы «растение-хозяин – патогенная бактерия – бактериофаг», во многом определяется влиянием биотических и абиотических факторов окружающей среды. Адаптация макро- и микроорганизмов к изменяющимся условиям среды, а также их взаимное влияние друг на друга приводит к тому, что в каждой экосистеме развиваются свойственные только этой экосистеме организмы, наиболее приспособленные к данным условиям окружающей среды. Поэтому для разработки эффективных мер борьбы с патогенами необходимо изучить биоэкологические свойства целевых организмов, сформировавшихся в данной экосистеме. Следовательно, для эффективного применения фаготерапии в борьбе с бактериальным ожогом плодовых в Республике Молдова необходимо изучить свойства местных изолятов бактерий *E. amylovora* и лизирующих их бактериофагов.

Цель исследований: Выявление биологических особенностей патогена *Erwinia amylovora* и изучение возможности применения бактериофагов в борьбе с бактериальным ожогом плодовых.

Задачи исследований следующие:

- выделить, идентифицировать и охарактеризовать патогенность вирулентных изолятов бактерии *E. amylovora* (Burrill) Winslow et al;
- выделить и идентифицировать бактериофаги возбудителя бактериального ожога плодовых бактерии *E. amylovora* (Burrill) Winslow et al;
- определить особенности роста бактериофагов *E. amylovora* в искусственных и естественных условиях;
- определить биологическую эффективность бактериофагов *E. amylovora* в борьбе с бактериальным ожогом плодовых на растениях, произрастающих в естественных условиях.

1.5. Выводы к главе 1

На основании анализа данных литературы можно сделать следующие выводы:

1. Бактериальный ожог плодовых представляет серьезную угрозу в районах с развитым плодоводством. В годы с благоприятными для роста патогена метеорологическими условиями заболевание может нанести серьезный экономический ущерб производителям груш, яблок и айвы.
2. Известные в настоящее время факторы вирулентности возбудителя бактериального ожога – это способность вырабатывать ЭПС, аппарат ССТТ, молекулы

системы *quorum sensing*, сидорофор десферриоксамин E, металлопротеаза PrtA, регуляторная РНК rsmB, плаزمида pEA29 и др.

3. Высокая вредоносность заболевания обусловлена тем, что в одной экосистеме могут присутствовать штаммы бактерий с разным проявлением факторов вирулентности, что позволяет патогену быстро приспосабливаться к воздействию внешних (климатические условия, химические обработки) и внутренних (изменение метаболизма на разных фазах развития растения, защитные механизмы растений) факторов окружающей среды.

4. В качестве мер борьбы с бактериальным ожогом применяются агротехнические, химические и селекционные приемы. В последние годы большое внимание уделяется разработке экологизированных средств защиты с применением микроорганизмов, естественных обитателей плодовых садов.

5. Одним из элементов экологизированной системы защиты садов от бактериального ожога плодовых может быть фаготерапия – использование бактериофагов, способных лизировать клетки бактерий. В настоящее время в лабораториях мира исследуется возможность применения фаготерапии в борьбе с бактериальным ожогом плодовых.

6. Основными недостатками фаготерапии являются высокая чувствительность фагов к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды, способность переносить участки геномов, кодирующие нежелательные свойства бактерий-хозяев.

7. Преимущества фаготерапии заключаются в том, что фаги действуют только на бактерии хозяева и не представляют опасности для других организмов, а препараты на основе бактериофагов достаточно просто производить.

8. Бактериофаги способны сдерживать проявление бактериального ожога плодовых и могут применяться в комплексе с другими мероприятиями по предотвращению распространения данного бактериоза.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Место и условия проведения опытов

Работы по выделению и идентификации бактерий и бактериофагов проводили в лаборатории фитопатологии и биотехнологии, Института генетики, физиологии и защиты растений, Кишинев; лаборатории защиты растений, Научно-практического института садоводства, виноградарства и пищевых технологий, Кишинев; лаборатории микробиологии и биотехнологии, Института биологической защиты растений, Дармштадт (ФРГ).

Материал для исследований отбирали в насаждениях розоцветных на территории Республики Молдова; в опытном саду научно-практического института садоводства и технологии пищевой промышленности, Кишинев. Опыты по изучению биологической эффективности бактериофагов проводили на опытном участке на территории Института генетики, физиологии и защиты растений, Кишинев; в плодовых насаждениях хозяйства «AgroVrio» коммуны Бачой, Яловенского района.

Исследования осуществляли в центральной и южной зонах Республики Молдова в 2001-2015 гг. в следующих природно-климатических условиях:

Климат умеренно-континентальный, характеризуется короткой теплой зимой и продолжительным жарким летом. Среднее годовое количество осадков в пределах 380–550 мм. Продолжительность теплого периода в среднем составляет 260-270 дней – на севере, 270-280 дней – в центральной части и 280-290 дней – на юге республики. Среднегодовая температура воздуха колеблется от +7,5 до +9,9⁰С. Абсолютный годовой максимум приходится на июль или август и доходит на севере до +38⁰С, в центральных и южных районах до +41⁰С. Абсолютный годовой минимум составляет от -30 до -33⁰С. Среднемесячная температура самого теплого месяца (июля) на севере равна +19,5⁰С, на юге +22,2⁰С. Среднемесячная температура самого холодного месяца (января) на севере – минус 6⁰С, на юге – минус 4⁰С.

Зима продолжается от 79 дней на юге и до 100 – на севере республики. Резкие понижения температуры, ниже минус 15⁰С, продолжаются, в среднем, от 3 до 7 дней. В зимнее время при поступлении воздушных средиземноморских масс, на территории республики наблюдается оттепель с температурой выше 5⁰С. Число дней с оттепелью составляет, в среднем, от 45 дней на севере до 60 дней – на юге. Снежный покров незначителен и неустойчив, его высота достигает 10 см, в редкие годы – 20 см и выше.

Весной наблюдается быстрое повышение среднесуточных температур с резким изменением погоды.

Летом температура воздуха значительно устойчивее, чем зимой. Вторая половина лета отличается более высокими температурами и меньшим количеством осадков.

Осень в Республике Молдова, как правило, теплая и продолжительная, с большим количеством ясных дней. В начале сентября нередко наступает резкое похолодание, начинаются первые осенние заморозки; иногда заморозки наступают в конце октября или в начале ноября. В первой половине декабря обычно наступают холода, и замерзает поверхностный слой почвы [3].

Осадки. Республика Молдова находится в зоне недостаточного увлажнения; среднее годовое количество осадков составляет около 370–550 мм. Количество осадков уменьшается в направлении с северо-запада на юго-восток. Наибольшие суммы годовых осадков (500–550 мм) наблюдаются на северо-западе республики и на западных склонах Центрально-Молдавской возвышенности.

В южных и юго-восточных районах республики, а также в долинах рек Прут и Днестр годовая сумма осадков составляет преимущественно 400–450 мм. Минимум осадков (до 400 мм) наблюдается на крайнем юго-западе республики (районы Вулкэнешть, Чадыр-Лунга). На остальной части территории республики за год выпадает 450–500 мм осадков. Больше всего осадков, которые носят ливневый характер, наблюдаются в летний период: около 75–80 % от годового количества. Ливневые дожди, как правило, сопровождаются грозами и сравнительно редко - градом (в среднем, за лето бывает 1–2 дня с градом).

Характерной чертой климата Республики Молдова являются засушливые периоды, которые особенно ощутимы летом. Эти периоды характеризуются продолжительным отсутствием осадков, высокой температурой и низкой относительной влажностью воздуха. В теплое время года бывают суховеи. Наибольшее число дней с суховеями в теплый период времени отмечается в центральной и южной частях республики (от 20 до 46 дней).

Количество осадков за холодный период (декабрь – март) колеблется на большей части территории Молдовы от 90 до 100мм, увеличиваясь только на возвышенностях до 130мм. Благодаря короткой и теплой зиме, всего около 10% осадков за год выпадает в виде снега [3].

Рельеф местности представляет собой холмистую равнину, расчленённую речными долинами, которые занимают около 64% территории. Средняя высота над уровнем моря 147м.

Данные о метеорологических условиях в период проведения опытов были предоставлены доктором сельскохозяйственных наук Татьяной Третьяков, а также взяты из работы Spoială [5] и на сайтах <http://www.meteo.md/> [3], <http://www.pogodaiklimat.ru/> [27].

2.2. Материалы и методы исследований

Материалом исследований являлись:

1) бактерии *Erwinia amylovora*, выделенные из айвы, яблони, груши и боярышника (семейство Розоцветные);

2) бактериофаги *Erwinia amylovora*, выделенные из кроны айвы, яблони, груши и боярышника (семейство Розоцветные) и из почвы у стволов растений;

3) штамм бактерии *Erwinia amylovora*, Ea179, штаммы бактериофагов, phiEa1h (*Podoviridae*) и phiEa104 (*Myoviridae*), выделенные в Северной Америке, любезно предоставленные профессором Клаусом Гайдером (Julius Kühn-Institute, Dossenheim, Germany).

Тестирование на наличие бактерий и бактериофагов, проводили на сортах плодовых, чувствительных к бактериальному ожогу: на айве сортов Южанка, Кодрянка, Ауриу; на груше сортов Вильямс, Любимица Клаппа, Кюре, Сокровище, Ноябрьская, Выставочная, Бронзовая, Бере Боск, Бере; на яблоне сортов Мельба, Слава Победителям, Голден Делишес, Мантуанское, Джонатан. Кроме того, в опытах использовали гибриды айвы, яблони и груши, полученные в Научно-практическом институте садоводства и технологии пищевой промышленности, г. Кишинев.

Изучение свойств выделенных бактерий и бактериофагов и испытание биологической эффективности выделенных бактериофагов проводили на зеленых плодах груши; на огурцах с семядольными и первыми настоящими листьями; на сеянцах и саженцах яблони, груши и айвы, высаженных в лаборатории и в теплице; черенках подвоев айвы; подвоях айвы, высаженных на опытном участке; на яблоне в саду коммуны Бачой.

В работе использовали следующие методы исследований:

Выделение и идентификация бактерий *E. amylovora*. Бактерии *E. amylovora* выделяли по общепринятой методике выделения фитопатогенных бактерий [20], методом Уайта (Waite M. B.), описанным для идентификации вирулентных штаммов бактерии *E. amylovora*, и с использованием методов, рекомендованных ЕРРО для диагностики бактериального ожога [185]. Органы растений, пораженные бактериальным ожогом (листья с некротизированными жилками, цветки, плоды, изогнутые в виде посоха побеги, а также кору) промывали водопроводной, а затем стерильной водой. Стерильным скальпелем вырезали кусочек на границе больной и здоровой ткани. Образец измельчали, помещали в стерильную водопроводную воду и сутки инкубировали при температуре +28⁰С. Через 24 часа, полученный экстракт фильтровали через бумажный фильтр.

Для упрощения выявления вирулентных изолятов бактерий *E. amylovora*, фильтрат наносили на незрелые плоды груши, помещали во влажную камеру и инкубировали при

температуре +28⁰С. При появлении молочно-белого экссудата, капли экссудата наносили на поверхность питательных сред в чашках Петри.

В отсутствие зеленых плодов груши, фильтрат наносили на поверхность питательной среды в чашки Петри. Чашки помещали в термостат и инкубировали при температуре +28⁰С. Через 48 часов инкубации выявляли колонии бактерий *E. amylovora*, характерные для данной питательной среды.

Бактерии *E. amylovora* культивировали на питательных средах, в том числе, рекомендованных ЕРРО [185]:

1. Среда Кинга Б: пептон 20 г; глицерин 10 мл; K₂HPO₄ 1,5 г; MgSO₄ • 7H₂O 1,5г; агар 15-20 г; дистиллированная вода 1 л, рН 7,0 - 7,2.

2. Агар Лурия-Бертрани (ЛБ): пептон 10 г; дрожжевой экстракт 5 г; NaCl 10 г; агар 15 г; дистиллированная вода 1 л, рН 7,5.

3. Питательный бульон Лурия-Бертрани (ЛБ): пептон 10 г; дрожжевой экстракт 5 г; NaCl 10г; дистиллированная вода 1 л, рН 7.5.

4. Питательная среда С3 с содержанием глюкозы, свободных аминокислот и микроэлементов, рН 7,2.

5. Питательная среда ММ1: L аспарагин 1,5 г, K₂HPO₄ 3.5 г, KH₂PO₄ 1,5 г, (NH₄)₂SO₄ 1 г, MgSO₄•7H₂O 5 мг, натрия цитрат х 2H₂O, Na₃C₆H₅O₇ 0.25 г, никотиновая кислота 0,25 г, тиамин гидрохлорид 0,2 г, сорбитол 10 г, дистиллированная вода 1 л, рН 7,5.

6. Питательная среда ММ2Cu [58]: L-аспарагин 4,0 г, K₂HPO₄ 2,0 г, MgSO₄•7H₂O 0,2 г, NaCl 3,0 г, никотиновая кислота 0,2 г, тиамин гидрохлорид 0,2 г, сорбитол 10 г, CuSO₄ 0,4 г, агар 15 г; дистиллированная вода 1 л, рН 7,5.

7. Левановая среда: дрожжевой экстракт 2 г; пептон 5 г; NaCl 5 г; сахароза 50 г; агар 20 г; дистиллированная вода 1 л, рН 7,0 - 7,2.

Идентификация бактерий *E. amylovora* и бактериофагов *E. amylovora* методом электронной микроскопии. Суспензию бактерий или фаголизат наносили на медную сеточку и негативно контрастировали в водном 1% растворе уранилацетата. После этого промывали дистиллированной водой в течение 4 секунд. Изображения бактерий и бактериофагов получали с помощью электронного микроскопа TESLA BS 500 при увеличении в 7 000, 8 000 и 24 000 раз.

Определение реакции гиперчувствительности изолятов бактерии *E. amylovora*. Реакцию гиперчувствительности, которую бактерии *E. amylovora* вызывают на растениях-нехозяевах, изучали методом, описанным J. Cabrefiga (2005) [78]. Суспензию *E. amylovora* в концентрации 10⁷ КОЕ/мл вводили в межжилковое пространство семядольных листьев огурцов. В каждый лист делали по 4 инъекции. Каждый изолят бактерий испытывали не

менее, чем на 5 растениях. Некрозы, возникавшие в результате ответной реакции растения на инъекцию бактерий *E. amylovora* оценивали по шкале: 0 – отсутствие некрозов; 0,1-0,2 – некрозы 5% поверхности листа; 0,3-0,5 – некрозы 25% поверхности листа; 0,6-0,8 – некрозы 75% поверхности листа; 0,9-1,0 – некрозы 90% поверхности листа.

Определение вирулентности изолятов бактерии *E. amylovora*. Вирулентность изолятов *E. amylovora* определяли методом обработки зеленых плодов груши суспензией *E. amylovora* в концентрации 10^7 КОЕ/мл в 5 кратной повторности. О вирулентности судили по скорости проявления симптомов на незрелых плодах груши и оценивали по шкале: 0 – отсутствие симптомов; 0,1-0,3 – слабые некрозы; 0,3-0,5 – некрозы средней интенсивности; 0,6-0,8 – некрозы, следы экссудата; 0,9-1,0 – обильный экссудат и некрозы.

Искусственное заражение плодовых бактериями *E. amylovora*. Искусственное заражение черенков яблони и груши проводилось по методике, предложенной Никитиной К.В. и др., (1974) [25]. Срезанные с деревьев яблони и груши черенки 20 минут промывали проточной водопроводной водой и помещали в сосуды с водой. Одновременно готовили суспензию суточной культуры бактерии *E. amylovora* в концентрации 3×10^7 КОЕ/мл, которой заражали черенки уколом в точку роста побега и в пестики цветков. Черенки груши заражали в периоды обособления бутонов, раскрытия бутонов и полного опадения лепестков, а черенки яблони – в периоды раскрытия бутонов, начала опадения лепестков и полного опадения лепестков. Контролем служили черенки, обработанные дистиллированной водой. Опыт проводился в трех повторностях, по 3 черенка в каждой. Степень проявления симптомов оценивалась по модифицированной нами для зараженных черенков, 4-балльной шкале, приведенной в работе W-S Kim & K. Geider (2000) [132]. При этом 0 баллов – это отсутствие симптомов; 1 балл – увядание цветков и листьев; 2 балла – слабые некрозы на листьях и побегах, преждевременное опадение лепестков; 3 балла – увядание побегов, побурение завязей; 4 балла – сильное увядание молодых побегов, сильные некрозы на листьях или выделение экссудата.

Выделение и идентификация бактериофагов *E. amylovora*. Изолирование и очистку фагов проводили двумя способами:

1. Методом агаровых слоёв [7]: 2,5 г пораженных бактериальным ожогом частей растений тщательно промывали проточной, а затем дистиллированной водой, измельчали помещали в чашки Петри с дистиллированной водой и 24 часа инкубировали при температуре $+28^{\circ}\text{C}$. Полученный экстракт фильтровали через бумажный фильтр и вносили в пробирки с жидкой питательной средой (ЛБ бульон), предварительно засеянной культурой бактерии *E. amylovora*. Пробирки помещали в термостат с температурой $+28^{\circ}\text{C}$. Через 24 часа содержимое пробирок отфильтровывали и центрифугировали 30 минут при

8000g. Надосадочную жидкость собирали в отдельные пробирки, добавляли хлороформ и тщательно встряхивали до полного выветривания хлороформа. После этого в предварительно подготовленные пробирки с разогретой до +38⁰С мягкой питательной средой (0,7% агар) вносили суточную культуру индикаторной бактерии с титром 3 x 10⁷ КОЕ/мл и надосадочную жидкость. Смесь встряхивали, наносили на чашки Петри с твердой питательной средой (1,5% агар) и помещали в термостат при температуре +28⁰С. Через 24 часа определяли наличие или отсутствие колоний лизиса, которые бактериофаги образуют на бактериальном газоне.

2. С использованием элементов и приемов, описанных в работах Adams [6], Schnabel and Jones [202], Boulé et al, [70]. Надземные части растений и/или почвы, собранной у растений с симптомами бактериального ожога, смешивали со стерильной водопроводной водой. Образцы фильтровали через 0,45 микронный мембранный фильтр. Пять миллилитров фильтрата бактериофагов использовали для инокуляции 5мл жидкой культуры *E. amylovora*, которую инкубировали в течение 24 часов при температуре +28⁰С с встряхиванием. Через 18 часов культуры центрифугировали при 8000g и температуре +4⁰С в течение 20 минут. 100 мкл надосадочной жидкости смешивали с 100 мкл *E. amylovora*, добавляли в 3 мл мягкого агара (0,7%) и наносили на слой твердого агара (1,5%). Чашки инкубировали при температуре +28⁰С. Через 24 и 48 часов инкубации чашки проверяли на наличие колоний лизиса, которые бактериофаги образуют на бактериальном газоне. Затем отдельные колонии лизиса собирали и помещали в 1мл жидкой питательной среды (питательный бульон ЛБ), добавляли 10 мкл хлороформа и центрифугировали при 8000g в течение 5 минут. Надосадочную жидкость помещали в стерильные пробирки для микроцентрифугирования и трижды пересевали, используя метод агаровых слоев до получения 50 колоний лизиса на чашку. В качестве накопительных культур бактерий хозяев использовали выделенный нами изолят бактерии *E. amylovora* и штамм Ea179.

Концентрацию бактерий и бактериофагов в 1 мг проб почвы и тканей растений вычисляли по формуле 2.1. [38].

$$N = \frac{1\text{мл} \times n}{V}, \quad (2.1)$$

где

N – Количество бактерий/ бактериофагов в единице объема;

n – Количество негативных колоний (для бактериофагов)/количество колоний бактерий на плотной питательной среде в чашке Петри;

V – Объем пробы, взятой для посева на плотную питательную среду в чашке Петри.

Идентификация бактериофагов *E. amylovora* методом ПЦР. Геномную ДНК фагов экстрагировали и очищали по стандартной методике с использованием кита DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany). ПЦР реакции осуществляли в амплификаторе Biometra TGradient при следующих условиях: первичная денатурация 3 минуты при 94⁰С; 35 трехступенчатых циклов 3 с при 94⁰С, 30 с при 50⁰С; 3 минуты при 72⁰С; финальная элонгация 5 минут при 72⁰С. Результаты ПЦР анализировали электрофорезом в 1,0% горизонтальном агарозном геле; полосы, окрашенные этидиум бромидом, наблюдали при УФ свете. Для специфических контрольных реакций использовали выделенные в Северной Америке изоляты фага phiEa1h (*Podoviridae*) и phiEa104 (*Myoviridae*) [171]. Филогенетический анализ последовательностей геномов фагов осуществляли с помощью программы MEGA5.2 [215].

Определение эффективности подавления роста *E. amylovora* бактериофагами в условиях лаборатории на зеленых плодах груши. Для определения эффективности подавления роста *E. amylovora* бактериофагами в условиях лаборатории кусочки незрелых плодов груши помещали во влажную камеру и обрабатывали суспензией суточной культуры *E. amylovora* в концентрации 3x10⁷ КОЕ/мл, после чего на обработанные кусочки груши наносили суспензию бактериофагов в концентрации 2x10⁸ БОЕ/мл. Для опыта был взят изолят *E. amylovora*, которым заражали черенки яблони и груши при проверке возможности искусственного заражения черенков *E. amylovora* в условиях лаборатории. Контролем служили незрелые плоды груши, обработанные *E. amylovora* и дистиллированной водой и незрелые плоды груши, обработанные только дистиллированной водой. Опыт проводили в трёх повторностях, по пять образцов в каждой. Учет проявления симптомов на зараженных грушах проводился в течение 7 дней после обработки. Результаты оценивались по 4 балльной шкале, приведенной в работе W-S Kim & K. Geider (2000) [132], согласно которой 0 баллов – отсутствие некрозов и экссудата; 1 балл – слабые некрозы; 2 балла – сильные некрозы; 3 балла – некрозы и слабый экссудат; 4 балла – обильный экссудат и некрозы.

Определение эффективности подавления роста *E. amylovora* бактериофагами в условиях лаборатории на срезанных побегах подвоев айвы. Для определения биологической эффективности бактериофагов *E. amylovora* в подавлении бактериального ожога плодовых срезанные черенки опытных растений инфицировали изолятом бактерии *E. amylovora*, выделенным из яблони, и обрабатывали их бактериофагами. Концентрация бактериальной суспензии была 3x10⁷ КОЕ/мл, а концентрация бактериофагов 2x10⁹ БОЕ/мл. Обработку проводили в двух вариантах: 1) в условиях 100% влажности и температуре +28⁰С; 2) при влажности 70% и температуре +18⁰С. Контролем служили черенки подвоев

айвы, обработанные дистиллированной водой. Интенсивность заболевания оценивали, вычисляя отношение длины пораженной части побега к общей длине побега и выражая его в процентах [143].

Оценка влияния бактериофагов на развитие саженцев яблони в лабораторных условиях. Для определения влияния бактериофагов на развитие пораженных бактериальным ожогом растений саженцы яблони, произрастающие в условиях лаборатории, инфицировали изолятом бактерии *E. amylovora*, выделенным из яблони и обрабатывали бактериофагами. Концентрация бактериальной суспензии была 3×10^7 КОЕ/мл, а концентрация бактериофагов 2×10^9 БОЕ/мл. Контролями служили саженцы яблони, обработанные бактериями и дистиллированной водой. Учитывалось наличие симптомов заболевания и общее состояние растений на разных стадиях развития в течение одного вегетационного сезона.

Определение биологической эффективности бактериофагов *E. amylovora* в подавлении бактериального ожога плодовых на подвоях айвы, высаженных в открытом грунте. Для определения биологической эффективности бактериофагов *E. amylovora* подвой айвы, высаженные в открытом грунте, заражали инъекцией суспензии бактерии *E. amylovora* в концентрации 3×10^7 КОЕ/мл. После чего растения опрыскивали фаголизатами в концентрации 2×10^9 БОЕ/мл. Контролем служили подвой айвы, обработанные дистиллированной водой. В качестве химического контроля использовали медьсодержащий препарат Купромакс, который применяли в концентрации 3 кг/га [2]. При проявлении типичных симптомов заболевания, биологическую эффективность бактериофагов рассчитывали по интенсивности проявления заболевания методом Lee [144]. В отсутствие или при слабом проявлении симптомов поражения патогеном, биологическая эффективность бактериофагов оценивалась по средней длине побегов.

Биологическую эффективность бактериофагов (%) в отношении распространенности болезни в сравнении с контролем рассчитывали по модифицированной формуле Аббота (2.2) [28]:

$$C = \frac{100(P-p)}{P}, \quad (2.2)$$

где

P – распространенность болезни в контроле;

p – распространенность болезни в опытном варианте.

Для оценки распространенности болезни применяли формулу 2.3 [28].

$$P = \frac{n}{N} \times 100\%, \quad (2.3)$$

где

n – Количество больных растений;

N – Общее количество растений в пробах.

Интенсивность развития болезни (%) на участке определяли по формуле 2.4 [28].

$$R = \frac{100 \sum(n \times b)}{N \times K}, \quad (2.4)$$

где

n – Число пораженных растений;

b – Соответствующий балл их поражения;

N – общее число растений в пробе;

K – высший балл шкалы учета.

При использовании балловой шкалы учета придерживались градации:

0 – признаки заболевания отсутствуют;

1 – поражено до 10 % поверхности растения или его отдельных органов;

2 – поражено 11 - 25 % поверхности растения или его отдельных органов;

3 – поражено 26 - 50 % поверхности растения или его отдельных органов;

4 – поражено более 50 % поверхности растения или его отдельных органов.

Математическую обработку данных проводили по методике, описанной Доспеховым (1985) [13]. Для построения диаграмм использовали пакет программ Microsoft Office Excel.

2.4. Выводы к главе 2

1. В качестве объектов исследований были взяты выделенные нами бактерии возбудители бактериального ожога и бактериофаги, активные в отношении этих бактерий.

2. Идентификацию бактерий проводили методами Уайта, посева на плотные диагностические среды и электронной микроскопии.

3. Идентификацию бактериофагов проводили методами электронной микроскопии и ПЦР.

4. Вирулентность бактерий определяли методами инокуляции незрелых плодов груши; заражения неспецифических растений-хозяев и отдельных органов плодовых

(цветков, побегов); инфицирования растений в вегетационных сосудах в условиях лаборатории и на опытном участке.

5. Литические свойства бактериофагов определяли методом подсчета негативных колоний на бактериальном газоне на плотной питательной среде; путем оценки выделения экссудата на обработанных тест-бактериями зеленых плодах груши; методом учета проявления симптомов поражения болезни на срезанных частях опытных растений и зараженных патогеном опытных растениях, содержащихся в условиях лаборатории и в открытом грунте.

6. Исследование бактерий и бактериофагов с применением классических и современных методов выделения и идентификации микроорганизмов позволило получить сведения о видовом составе системы «бактерия *E. amylovora* – бактериофаги *E. amylovora*» в насаждениях розоцветных в Республике Молдова.

7. Исследование способности бактериофагов подавлять рост патогенных бактерий *E. amylovora in vitro* и *in vivo* позволило определить биологическую эффективность вирулентных бактериофагов *E. amylovora* в подавлении бактериального ожога плодовых.

3. ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИИ *ERWINIA AMYLOVORA* И БАКТЕРИОФАГОВ *ERWINIA AMYLOVORA*

3.1. Выявление и идентификация возбудителя бактериального ожога плодовых бактерий *Erwinia amylovora*

Как и многие другие фитопатогенные бактерии, возбудитель бактериального ожога, бактерия *E. amylovora* проникает в растения-хозяева через естественные отверстия [20]. Бактерии попадают в растения через рыльце пестика, а также в раны, которые образуются при механическом повреждении органов растений. Кроме того, переносчиками бактерий служат насекомые [223]. Особую опасность представляют эпифитные популяции бактерий на цветках.

При высокой концентрации бактериальная масса препятствует передвижению питательных и пластических веществ по сосудам растения, вызывая тем самым усыхание пораженных органов, в частности, усыхание молодых побегов в виде крючка. Нередко под давлением большого количества бактерий происходит разрыв молодых тканей, и бактериальная масса появляется на поверхности пораженных органов растений в виде экссудата. Вначале экссудат бывает молочно белого цвета, а затем, под воздействием окружающей среды, становится молочно-коричневым.

Передвигаясь по сосудам растений с помощью перитрихально расположенных жгутиков, бактерии колонизируют растения-хозяева, и при благоприятных условиях могут уничтожить значительную часть кроны или все растение. Описанные особенности развития бактерий *E. amylovora* в тканях растений-хозяев обуславливают как характерные симптомы поражения, так и оптимальное время проявления заболевания.

Сбор образцов растений для выделения патогенных бактерий *E. amylovora* проводился в промышленных и опытных плодовых садах Республики Молдова, а также в декоративных насаждениях на территории муниципия Кишинэу в 2000 – 2012 г. г. В ходе обследования были обнаружены растения подсемейства *Prunoideae* [72] с симптомами поражения бактериальным ожогом плодовых [29].

В 2000-2006 гг. выявление возбудителя бактериального ожога плодовых проводилось в яблонево-малиновом саду института защиты растений и экологического земледелия г. Кишинева. Сад был заложен в 1984 году на площади 16 га. В качестве мер борьбы с бактериальными болезнями в саду проводились обработки медьсодержащими препаратами.

В ходе проведенных обследований были обнаружены растения с симптомами поражения различными грибными и бактериальными заболеваниями. Так, были отмечены растения с мелкими округлыми некротичными пятнами на листовых пластинках и с древесиной черного цвета, что является характерными симптомами поражения

бактериальным раком косточковых *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* [9]. При нанесении водного экстракта, приготовленного из собранных тканей с описанными симптомами, на незрелых плодах груши выделялся прозрачный экссудат, нехарактерный для возбудителя бактериального ожога плодовых. Кроме того, были обнаружены плоды с пятнами отмершей ткани с concentрическими кольцами подушечек конидиального спороношения возбудителя плодовой гнили семечковых гриба *Monilia fructigena*. На листьях, побегах и плодах растений были отмечены симптомы поражения возбудителем парши яблони грибом *Venturia inaequalis* в виде бархатистых оливково-оранжевых пятен.

В 2000 г. на 9 деревьях яблони зимних сортов, произрастающих вблизи защитной лесополосы, был обнаружен очаг поражения бактериальным ожогом. Однако в следующие 6 лет исследований болезнь практически не распространялась. Следует отметить, что за время наблюдений отмечались высокие среднесуточные температуры в летний период, что несомненно способствовало сдерживанию распространения бактериального ожога. Можно предположить, что, многообразие микроорганизмов, присутствующих на растениях яблони и конкурирующих за источники питания, снижало скорость распространения бактериального ожога в исследованном нами саду [34].

Наблюдения показывают, что наиболее интенсивно развитие заболевания происходит весной во время цветения и роста побегов и в конце августа-начале сентября во время вторичного роста побегов. Оптимальные для развития бактерии условия: положительные температуры (от +10⁰С до +28⁰С) при высокой влажности воздуха. Активность насекомых-переносчиков, а также интенсивное выпадение осадков в период цветения растений-хозяев способствует распространению и развитию симптомов бактериального ожога. Поэтому, в условиях, благоприятных для роста патогена, отмечается высокая интенсивность поражения заболеванием.

Так, в 2003 году опытный сад айвы научно-практического института плодоводства и пищевых технологий был полностью поражен бактериальным ожогом. На растениях были обнаружены типичные симптомы, описанные для поражения возбудителем бактериального ожога плодовых бактерией *E. amylovora*: изогнутые в виде крючка усохшие молодые побеги, молочно-белый, буреющий на воздухе экссудат на побегах и цветоножках, усохшие цветки и мумифицированные плоды. На рисунке 3.1. показан сад айвы на территории муниципия Кишинэу, полностью пораженный бактериальным ожогом в 2003 году.



Рис. 3.1. Селекционные насаждения айвы, пораженные бактериальным ожогом.

Видно, что на всех деревьях имеются симптомы поражения бактериальным ожогом в виде усохших молодых побегов.

В ходе проведенных обследований на растениях был выявлен мутный экссудат на молодых побегах, что является одним из самых характерных проявлений болезни (рисунок 3.2).



a)



b)

Рис. 3.2. Экссудат на молодых побегах айвы (a) и яблони (b).

На рисунке 3.2. показан экссудат молочно-коричневого и темно-коричневого цвета, который является типичным симптомом поражения патогенными штаммами бактерии *E. amylovora*.

Были также выявлены усохшие молодые побеги с типичным при поражении бактериальным ожогом изгибом в виде крючка (рисунок 3.3. а, б), усыхание цветков и экссудат на пораженных цветоножках (рисунок 3.3 б.).



Рис. 3.3. Симптомы поражения бактериальным ожогом плодовых:

а) – изгиб в виде крючка на пораженной груше; б) – молодой побег яблони с усыхающими цветками, экссудатом на цветоножках и изгибом в виде крючка.

Известно, что некоторые возбудители болезней растений также способны вызывать выделение экссудата. Однако, при поражении бактериями *E. amylovora*, в отличие от возбудителя бактериального рака *Pseudomonas syringae*, выделяется мутный, а не прозрачный экссудат. Кроме того, древесина, пораженная бактериальным раком плодовых, становится черного, а не рыжего цвета.

Таким образом, в ходе обследования насаждений плодовых было установлено, что наиболее активно заболевание распространяется в молодых садах, а на растениях были выявлены типичные симптомы поражения патогенными бактериями *E. amylovora*: молочно-белый экссудат, буреющий на воздухе; усыхающие в виде пастушьего посоха побеги, а также мумифицированные плоды.

Органы растений с описанными симптомами были собраны и использованы в качестве исходного материала для выделения возбудителя бактериального ожога плодовых.

Идентификация бактерий *E. amylovora* методом Уайта. Первоначальную идентификацию бактерий *E. amylovora* проводили методом Уайта: водные экстракты отобранных тканей растений наносили на незрелые плоды груши и помещали во влажную камеру. Если в тестированных тканях присутствовали патогенные бактерии *E. amylovora* в высокой концентрации, то на незрелых плодах груши наблюдалось выделение молочно-белого экссудата (рисунок 3.4.). Кроме того, на рисунке 3.4. видно, что выделение экссудата сопровождалось некротизацией тканей незрелых плодов груши.

Метод Уайта был использован из-за его относительной простоты и высокой точности определения больших популяций патогенных бактерий *E. amylovora* [143, 239].

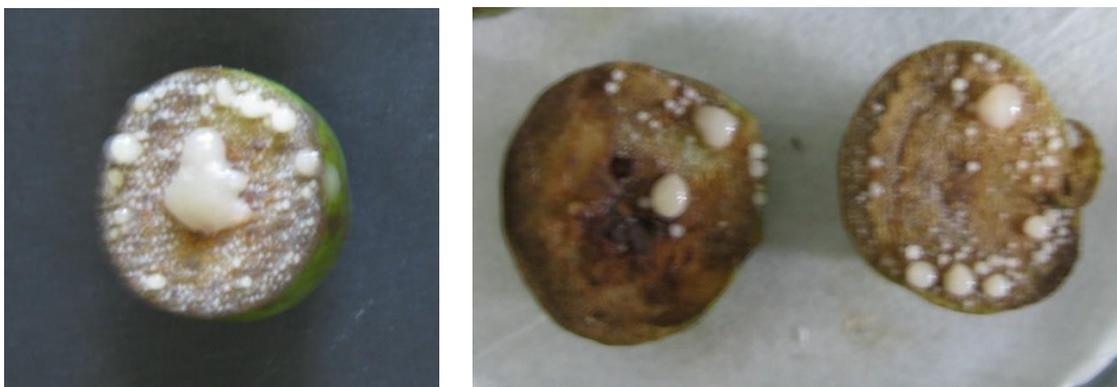


Рис. 3.4. Молочно-белый экссудат на незрелых плодах груши.

Задачей данного этапа работы было выделение и отбор изолятов бактерий для использования их в качестве накопительной культуры в дальнейших исследованиях. Поэтому тестировали, главным образом, молодые побеги с характерным изгибом в виде крючка, а также экссудат на молодых побегах и цветоножках. То есть, только такие образцы, которые с высокой долей вероятности могли содержать патоген, хотя известно, что патогенные бактерии *E. amylovora* могут присутствовать в растениях без видимых симптомов поражения [64]. Наименьшее время для проявления экссудата на зеленых плодах груши с момента инокуляции требовалось при обработке экстрактом, приготовленным из участков ткани пораженных растений, взятых на границе перехода пораженного участка в здоровые ткани. Это объясняется особенностями развития бактерий *E. amylovora* в тканях растений, и полностью согласуется с данными, описанными в литературе [185, 222, 223].

В таблице 3.1. приведены результаты тестирования органов растений с симптомами поражения бактериальным ожогом на наличие патогенных бактерий *E. amylovora*.

Таблица 3.1. Выявление патогенных бактерий *E. amylovora* методом Уайта в различных органах растений семейства *Rosaceae*

№ пробы	Время и место сбора	Растение	Образцы с симптомами поражения бактериальным ожогом	Выделение молочно-белого экссудата на незрелых плодах груши
1	май 2003 ¹	айва	увядшие не опавшие цветки	+
3	май 2003 ¹	айва	молодой усыхающий побег без экссудата	+
4	май 2003 ¹	айва	молодой побег с экссудатом	+
5	май 2003 ¹	айва	усохшие листья, обработанные медьсодержащими препаратами	+
6	июнь 2003 ¹	айва	экссудат на молодых побегах	+
7	май 2003 ¹	айва	мумифицированный плод	-
8	май 2006 ²	яблоня	увядшие, не опавшие цветки с экссудатом	+
9	май 2012 ²	яблоня	молодой побег с экссудатом	+
10	май 2012 ²	яблоня	экссудат на молодых побегах	+
11	май 2012 ²	яблоня	мумифицированный плод	-
12	июнь 2006 ³	груша	увядшие, не опавшие цветки с экссудатом	+
13	июнь 2012 ³	груша	молодой усыхающий побег без экссудата	+
14	июнь 2012 ³	груша	молодой побег с экссудатом	+
15	июнь 2012 ³	груша	экссудат на молодых побегах	+
16	июнь 2012 ³	груша	мумифицированный плод	-
17	май 2003 ⁴	боярышник	увядшие, не опавшие цветки	+
18	май 2006 ⁴	боярышник	молодой усыхающий побег без экссудата	+
19	май 2012 ⁴	боярышник	усохший побег без экссудата	+
20	май 2012 ⁴	боярышник	мумифицированные плоды	-

- ¹ – опытный сад Научно-практического института плодоводства и пищевых технологий;
- ² - плодовые насаждения хозяйства Agrobrió коммуны Бачой, Яловенского района;
- ³ – опытный сад института защиты растений и экологического земледелия;
- ⁴ – зеленые насаждения на территории г. Кишинева;
- «+» – наличие молочно-белого экссудата на незрелых плодах груши;
- «-» – отсутствие молочно-белого экссудата на незрелых плодах груши.

Из таблицы 3.1. видно, что на незрелых плодах груши молочно-белый экссудат выделялся при нанесении водных экстрактов молодых побегов айвы яблони, груши и боярышника как с экссудатом, так и без него. По данным, представленным в этой таблице также видно, что водные экстракты мумифицированных плодов айвы, яблони и груши и боярышника при нанесении их на незрелые плоды груши не вызывали выделение молочно-белого экссудата. Вероятно, это связано с относительно низкой чувствительностью метода Уайта. Более чувствительными методами идентификации доказано, что бактерии *E. amylovora* могут быть не только биотрофами или эпифитами, но также некротрофами и полу-некротрофами [207].

Дальнейшие исследования проводили с изолятами бактерий № 4, 8, 12 и 18, выделенными из растений родов *Cydonia* Mill., *Malus* Mill., *Pyrus* L., *Crataegus* L., соответственно, показавшие положительный результат при тестировании методом Уайта.

Рост бактерий на твердых питательных средах. Особенности роста и развития микроорганизмов обуславливают разницу в проявлении их роста на питательных средах с добавлением тех или иных питательных веществ и микроэлементов.

Известно, что одним из важных отличительных признаков бактерий является характер их роста на твердых диагностических и стандартных питательных средах. Размер, форма и цвет колоний, которые бактерии формируют на твердой питательной среде позволяют судить об их систематической принадлежности, а также о наличии или отсутствии способности инфицировать макроорганизмы – хозяева. У патогенных бактерий *E. amylovora* выявлены форма, размер и цвет колоний, которые они образуют при росте на диагностических и стандартных питательных средах [185]. Поэтому изучение свойств отобранных изолятов бактерий проводили также с помощью посева на стандартные питательные среды: среду Кинга Б, среду Лурия Бертрани (ЛБ) и питательную среду С3, а также на диагностические питательные среды: питательную среду с содержанием меди (ММ2Cu) и левановую питательную среду. На рисунке 3.5 и в таблице 3.2 показаны внешний вид колоний бактерий и характеристика роста изолятов бактерий при их культивировании на твердых питательных средах.

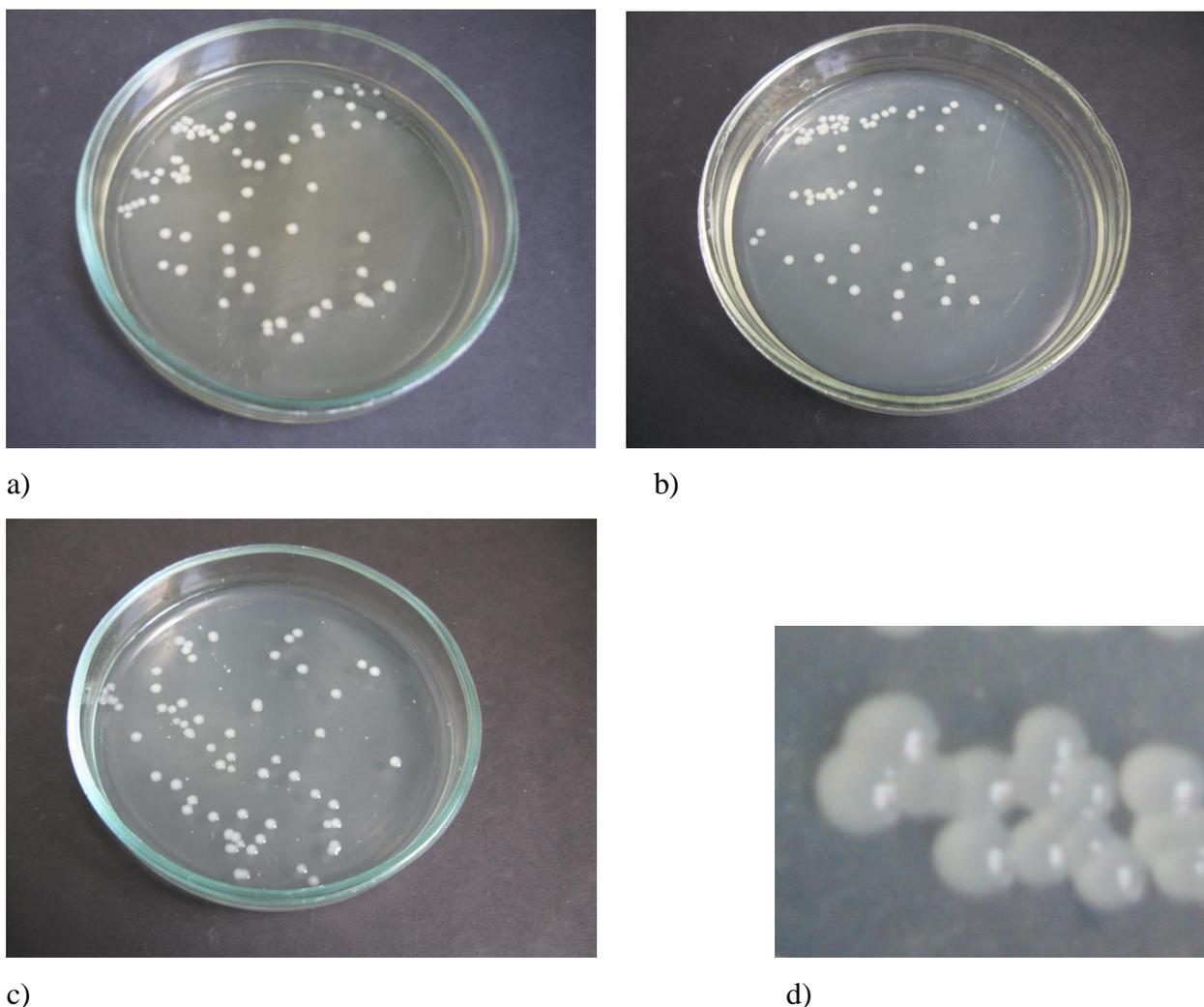


Рис. 3.5. Колонии патогенных изолятов бактерий *E. amylovora* при культивировании на питательной среде С3 (а), на ЛБ агаре (b), на левановой среде (с, d).

Наблюдения за ростом бактерий *E. amylovora* на питательной среде С3 выявили, что рост бактерий сопровождался образованием серовато-белых колоний S-типа. На питательном агаре ЛБ бактерии формировали колонии белого цвета без желтого оттенка. На левановой среде все изоляты образовывали выпуклые куполообразные колонии S-типа.

В таблице 3.2 представлена характеристика роста изолятов бактерий *E. amylovora*, выделенных из айвы (ЕаС03), яблони (ЕаМ06), груши (ЕаР06), боярышника (ЕаСг06) и штамма Еа179 на твердых стандартных и диагностических питательных средах: на ЛБ агаре, на среде Кинга Б, на среде ММ2Cu, на питательной среде, где бактерии *E. amylovora* активно продуцируют экзополисахарид леван, а также на питательной среде С3 с содержанием гидролизата рыбной муки.

Таблица 3.2. Характеристика роста изолятов бактерий *E. amylovora* на твердых питательных средах

Изолят бактерий	Питательная среда				
	Агар Лурия Бертрани	Кинг Б	ММ2Cu	Левановая	С3
ЕаС03	слабый рост	колонии без флуоресцирующ его пигмента	желтые колонии	типичные левановые колонии	актив ный рост
ЕаМ06	слабый рост	колонии без флуоресцирующ его пигмента	желтые колонии	типичные левановые колонии	актив ный рост
ЕаР06	слабый рост	колонии без флуоресцирующ его пигмента	желтые колонии	типичные левановые колонии	актив ный рост
ЕаСr06	слабый рост	колонии без флуоресцирующ его пигмента	желтые колонии	типичные левановые колонии	актив ный рост
Еа179	активный рост	колонии без флуоресцирующ его пигмента	желтые колонии	типичные левановые колонии	слабый рост

Все изученные нами изоляты бактерий при посеве на диагностическую среду ММ2Cu образовывали колонии желтого цвета. На среде Кинга Б колонии всех исследованных изолятов бактерий были без флуоресцирующего пигмента. на питательной среде С3 колонии бактерий были серовато-белыми S-типа, на питательном агаре ЛБ колонии были белыми, без желтого оттенка. На левановой среде все изоляты образовывали выпуклые куполообразные колонии S-типа. Однако, изоляты бактерий, выделенные в Молдове, в отличие от немецкого штамма Еа179, на питательной среде ЛБ росли хуже, чем на питательной среде С3. При анализе различий состава данных питательных сред было установлено, что в питательный агар ЛБ входит триптон, в то время как питательная среда С3 содержит гидролизат рыбной муки. То есть, эти питательные среды различаются по качественному и количественному составу аминокислот.

Таким образом, изоляты бактерий *E. amylovora*, выделенные на территории Республики Молдова, по росту на диагностических и стандартных питательных средах показывали рост, характерный для патогенных штаммов возбудителя бактериального ожога плодовых и на основании исследований, описанных выше, могут быть идентифицированы как вирулентные бактерии *E. amylovora*.

Идентификация бактерий *E. amylovora* методом электронной микроскопии. Изучение изолятов бактерий методом электронной микроскопии показало, что бактерии, выделенные нами из растений-хозяев семейства *Rosaceae*, представляют собой палочки с закругленными концами размером 1.7x1 мкм с перитрихиальным расположением жгутиков (рисунок 3.6.).

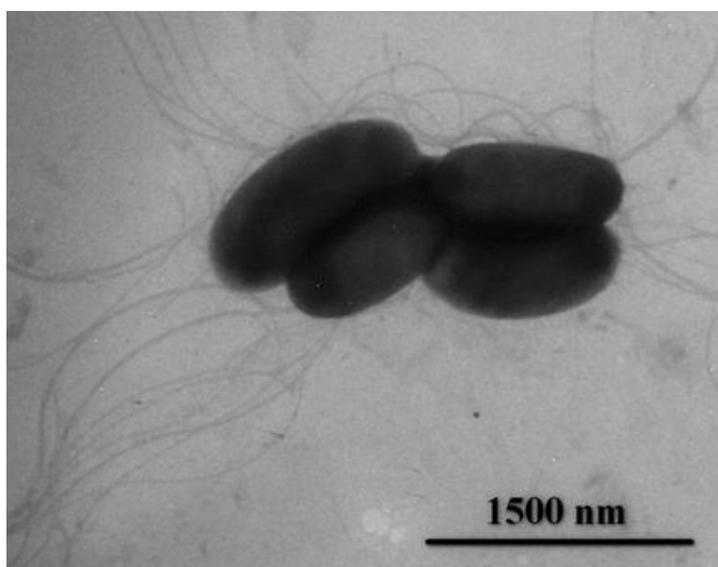


Рис. 3.6. Изображение бактерий *E. amylovora*, полученное при помощи электронного микроскопа.

Полученные данные о морфологии бактериальных клеток согласуются со сведениями о размере бактерий *E. amylovora*, опубликованными в работах по идентификации патогена, возбудителя бактериального ожога плодовых [9, 185].

Таким образом, методом Уайта, методом высева на твердые стандартные и диагностические питательные среды, а также методом электронной микроскопии из айвы, яблони, груши и боярышника выделены и идентифицированы вирулентные бактерии *E. amylovora*, которые вызывают типичные симптомы поражения бактериальным ожогом у представителей семейства *Rosaceae*.

Вирулентность и реакция гиперчувствительности изолятов *E. amylovora*. По данным литературы известно, что одним из важных свойств возбудителей заболеваний является вирулентность - количественная характеристика патогенности, т. е. способности организма заражать хозяина и вызывать симптомы заболевания. Также известно, что инфекционная способность штаммов *E. amylovora* зависит от сочетания и степени проявления различных факторов вирулентности. Так, в опытах, проведенных с изолятами *E. amylovora*, выделенными из яблони, было показано, что различия в интенсивности заболевания, которую вызывали штаммы *E. amylovora*, на 75.8% определялись четырьмя факторами вирулентности: способностью расти на незрелых плодах яблони, интенсивностью роста в сорбитоле, количеством синтезированного в культуре амиловорана и степенью индуцирования реакции гиперчувствительности [143].

Самым показательным признаком вирулентности бактерий *E. amylovora* является их способность вызывать симптомы заболевания на незрелых плодах яблони/груши [143, 239]. Сканирование генома *E. amylovora* с помощью технологии экспрессии генов *in vivo* (*gene expression technologies including in vivo expression technology IVET*) выявило 394 уникальных хромосомных гена, которые экспрессируются во время заражения незрелых плодов груши. При этом установлено, что ССТТ и ее главный эффектор DspE имеют важное значение для вирулентности *E. amylovora* при заражении незрелых плодов груш [239].

Другим важным свойством патогенов является реакция гиперчувствительности – местная защитная реакция, характеризующаяся быстрой гибелью клеток в месте инфицирования, что препятствует распространению патогена по тканям и органам растения [54, 131, 211]. Реакцию гиперчувствительности у устойчивых хозяев и у растений-нехозяев вызывают белки ССТТ. Показано, что чем более интенсивную реакцию гиперчувствительности вызывает штамм бактерии *E. amylovora*, тем он более вирулентен [143].

Учитывая приведенные ранее данные литературы, которые свидетельствуют о том, что вирулентность бактерий *E. amylovora* коррелирует с их способностью вызывать выделение молочно-белого экссудата на незрелых плодах груши и реакцию гиперчувствительности на растениях-нехозяевах [143, 239], для выявления наиболее вирулентного изолята бактерий *E. amylovora* была определена степень вирулентности на зеленых плодах груши и степень индуцирования реакции гиперчувствительности на листьях огурцов, которую вызывали изоляты *E. amylovora*, выделенные нами из различных растений подсемейства *Prunoideae*.

Результаты определения степени вирулентности и индуцированной реакции гиперчувствительности выделенных изолятов бактерий *E. amylovora* приведены на рисунке 3.7.

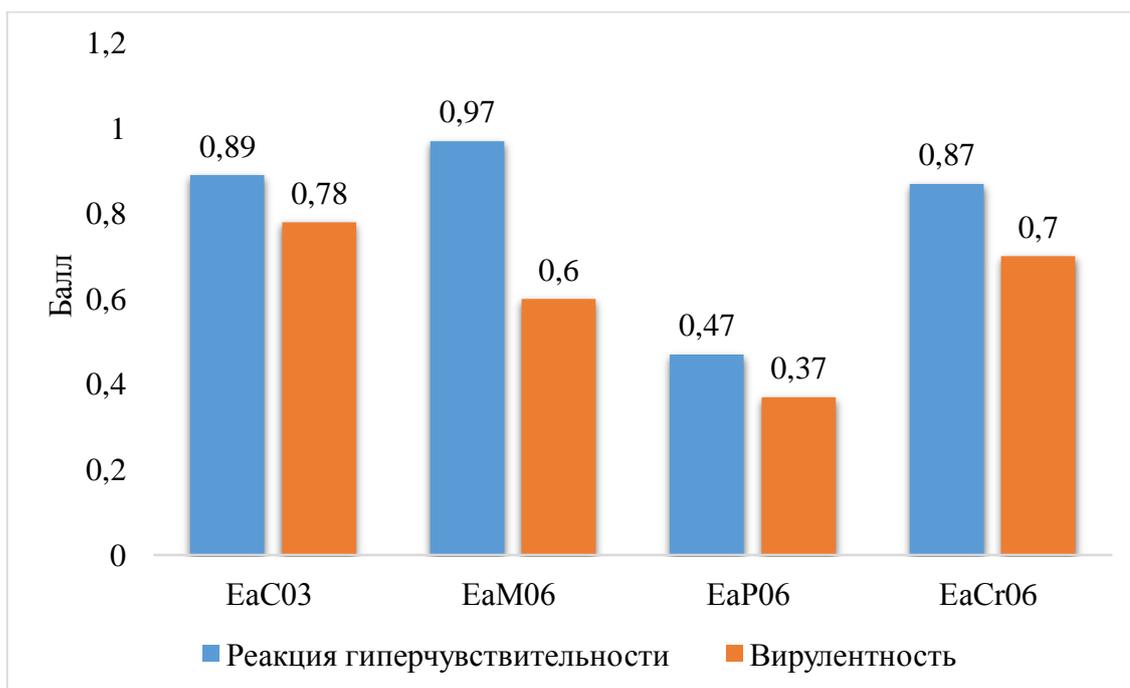


Рис 3.7. Вирулентность и индукция реакции гиперчувствительности изолятов *E. amylovora*.

t (яблоня - айва) $1,08 < t_{0.05(8)} 2,31$

t (яблоня - груша) $1,84 < t_{0.05(8)} 2,31$

t (боярышник -яблоня) $0,73 < t_{0.05(8)} 2,31$

t (айва-боярышник) $0,55 < t_{0.05(8)} 2,31$

Как следует из рисунка 3.7. вирулентность у выделенных нами изолятов *E. amylovora* коррелирует с их способностью индуцировать реакцию гиперчувствительности у растений-нехозяев. Так, изоляты *E. amylovora*, выделенные из айвы, яблони и боярышника, характеризуются как высокой степенью вирулентности, так и способностью индуцировать интенсивную реакцию гиперчувствительности, а патогены, выделенные из груши, показали низкую степень вирулентности и слабую способность индуцировать реакцию гиперчувствительности у растений-не хозяев. Однако различия в вирулентности изолятов не являются существенными.

В то же время известно, что штаммы бактерии *E. amylovora*, выделенные из различных растений подсемейства *Prunoideae*, на геномном уровне значительно отличаются друг от друга [52]. Кроме того, установлено, что бактерии *E. amylovora*, выделенные из яблони, груши и боярышника различаются по степени вирулентности [206], по количеству продуцируемых ЭПС [64], по специфичности по отношению к растениям

хозяевам [107]. В опытах Nevesi и др. штамм *E. amylovora* Ea 1, выделенный из яблони, был более вирулентным на незрелых плодах груши и культуре тканей яблони, чем штаммы *E. amylovora*, выделенные из других хозяев. Чуть менее вирулентным был штамм *E. amylovora* Ea 10, выделенный из груши, а штаммы *E. amylovora*, выделенные из кизильника и пираканты вызывали наименее слабые симптомы заболевания на незрелых плодах груши и на тканях яблони [118].

В наших опытах с изолятами возбудителя бактериального ожога плодовых, выделенными из различных растений-хозяев, изоляты патогена с высокой вирулентностью вызывали интенсивную реакцию гиперчувствительности на семядольных листьях огурцов. Однако, различия в степени вирулентности и индуцированной реакции гиперчувствительности у исследованных бактерий *E. amylovora*, выделенных из различных растений-хозяев не были отмечены. Можно предположить, что это связано с тем, что пробы отбирались в начале вегетационного сезона в молодых посадках на раннем этапе вспышки заболевания. Кроме того, насаждения растений из разных родов были расположены на сравнительно небольшой территории в непосредственной близости друг к другу. Поэтому гомогенность изолятов бактерий *E. amylovora* можно объяснить тем, что бактерии еще не успели адаптироваться к разным растениям-хозяевам [32].

Таким образом, сравнительная оценка вирулентности и индуцирования реакции гиперчувствительности показала, что изученные нами изоляты бактерии *E. amylovora* существенно не отличаются по вирулентности и способности индуцировать реакцию гиперчувствительности.

3.2. Выделение и идентификация бактериофагов *E. amylovora*

Проблема устойчивости фитопатогенных бактерий к антибиотикам, а также необходимость разработки экологически безопасных средств борьбы с болезнями растений привели к тому, что в последнее десятилетие проходит активный поиск и изучение бактериофагов, вирулентных к патогенным бактериям. В Европе и Америке выделены и охарактеризованы бактериофаги, вирулентные к патогенным бактериям *E. amylovora* [69, 108, 202], которые можно рассматривать как средство защиты от бактериального ожога плодовых, альтернативное антибиотикам и пестицидам.

Бактериофаги *E. amylovora* достаточно просто выделяются из растений и найдены во всех тканях, где обнаруживались патогенные бактерии *E. amylovora*, за исключением листьев без симптомов бактериального ожога [108, 194]. Установлено, что бактерии *E. amylovora* инфицируют хвостатые прокариотические вирусы из трех основных семейств *Myoviridae*, *Siphoviridae* и *Podoviridae* [69, 70, 108, 195, 202].

Для изучения видового состава бактериофагов *E. amylovora* в центральной части Республики Молдова в период с 2001 по 2013 гг. обследовались опытные и производственные насаждения айвы, яблони и груши, а также парковые массивы. Из пораженных органов растений с симптомами развития бактериального ожога и из почвы у стволов пораженных растений семейства *Rosaceae* изолировали бактериофаги, способные инфицировать клетки патогенных бактерий *E. amylovora*. Кроме того, пробы отбирали также и из растений, произрастающих в защитных лесополосах в непосредственной близости от насаждений культурных плодовых [29, 34].

На рисунке 3.8. показан пример действия бактериофагов на бактерии *E. amylovora* при посеве на твердую питательную среду.

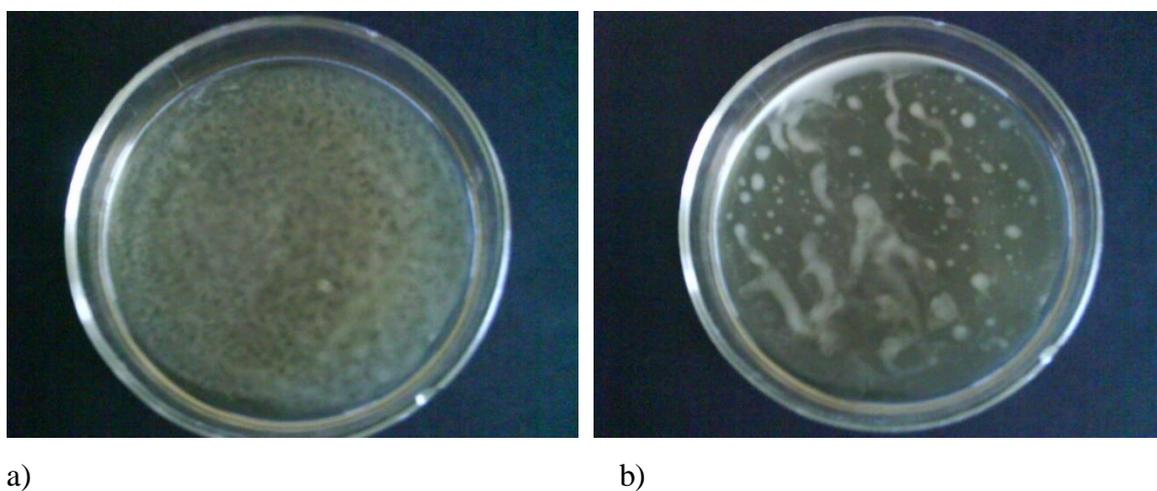


Рис. 3.8. Колонии лизиса на бактериальном газоне а- через 24 часа после посева, б – лизис бактериального газона через 48 часов после посева (изолят 605фСу1- а).

На рисунке 3.8. видно, что за 48 часов бактериофаги способны разрушить клетки бактерий *E. amylovora* на твердой питательной среде.

В дальнейших экспериментах были охарактеризованы 9 образцов бактериофагов, лизирующих бактерии *E. amylovora*, выделенных из кроны растений (груша, айва, яблоня, боярышник, вишня войлочная) и из почвы у стволов пораженных растений (4 образца). В таблице 3.3. представлены данные о концентрации выделенных бактериофагов *E. amylovora* в тканях растений-хозяев при первоначальном изолировании бактериофагов и о размере колоний лизиса, которые фаговые частицы формировали на бактериальном газоне при посеве на питательный агар ЛБ.

Таблица 3.3. Изоляты бактериофагов *E. amylovora*, выделенные на территории муниципия Кишинэу из растений семейства *Rosaceae*

Но мер изо лята	Изолят	Растение- хозяин	Источник	Средний диаметр колонии лизиса, мм	Концен трация, БОЕ/г*
1	503фМ2- а	<i>Malus domestica</i> Borkh.	крона растения	1.0-1.5	10 ²
2	503фР5- а	<i>Pyrus communis</i> L	крона растения	1.0-1.5	2x10 ²
3	503фР3- а	<i>Pyrus communis</i> L.	крона растения	1.0-1.5	4,2x10 ³
4	502фМ7- а	<i>Malus domestica</i> Borkh.	крона растения	1.0-1.5	2,5x10 ³
5	612фСу2- s	<i>Cydonia oblonga</i> Mill.	почва	1.0-1.5	10 ²
6	512фР2-s	<i>Pyrus communis</i> L.	крона растения	1.0-1.5	10 ²
7	511фСе1-а	<i>Cerasus tomentosa</i> (Thunb.) Wall	крона растения	1.0-1.5	10 ²
8	512фCr1 -s	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	почва	1.0-1.5	10 ²
9	512фМ1- s	<i>Malus domestica</i> Borkh.	почва	1.0-1.5	10 ²
10	502фCr1-а	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	крона растения	0.5-1.0	2,4x10 ⁴
11	605фСу1- а	<i>Cydonia oblonga</i> Mill.	крона растения	1.5-2	7x10 ⁴
12	512фМ5- а	<i>Malus domestica</i> Borkh.	крона растения	1.0-1.5	10 ²
13	612фМ3- а	<i>Malus domestica</i> Borkh.	почва	1.0-1.5	10 ²

* Концентрация фаговых частиц при первоначальном выделении в 1г пробы.

При этом наибольшая концентрация бактериофагов в естественных условиях обнаружена в образцах, взятых из кроны айвы. Меньше всего бактериофагов было в тканях яблони. Выявление бактериофагов, лизирующих клетки *E. amylovora*, в кроне *Cerasus tomentosa* (Thunb.) Wall свидетельствует о том, что в тканях представителей семейства *Rosaceae*, которые часто являются компонентами экосистем, где произрастают экономически важные плодовые, присутствуют бактериофаги, способные подавлять рост бактерий *E. amylovora*. То есть, растения, которые присутствуют в защитных лесополосах и в окружающих сады лесных массивах, могут служить не только источником патогенных бактерий, но и резерватом бактериофагов, способных лизировать фитопатогенные бактерии [31].

Размер колоний лизиса варьировал от 0,5-1,0 мм у боярышника до 1,5-2 мм у айвы (рисунок 3.9.), что полностью согласуется с данными литературы о морфологии колоний вирулентных бактериофагов *E. amylovora*, приведенными в работах Schnabel E. L. Jones A. L. [194] и Gill J.J. et al. [108].

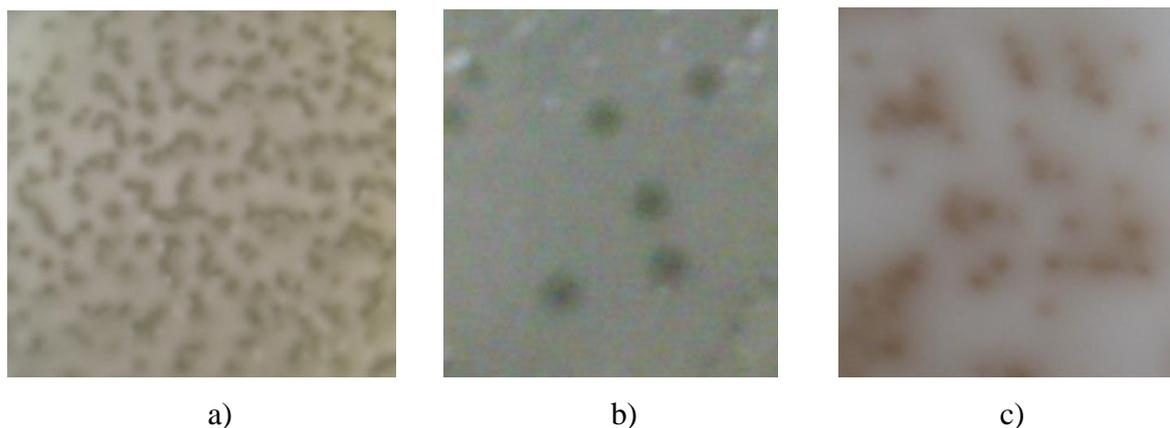


Рис.3.9. Колонии лизиса, образованные бактериофагами на бактериальном газоне, выделенными из яблони (а), айвы (b) и боярышника (с).

По данным литературы известно, что размер колоний лизиса, которые бактериофаги образуют на бактериальном газоне, хотя и зависит от плотности и состава питательной среды [205], но в то же время является одним из отличительных признаков, по которым возможно классифицировать вирусы бактерий [108].

Поэтому в дальнейших исследованиях, фаговые частицы, показавшие наибольшую устойчивость к процессу изолирования и очистки, были изучены с помощью электронного микроскопа.

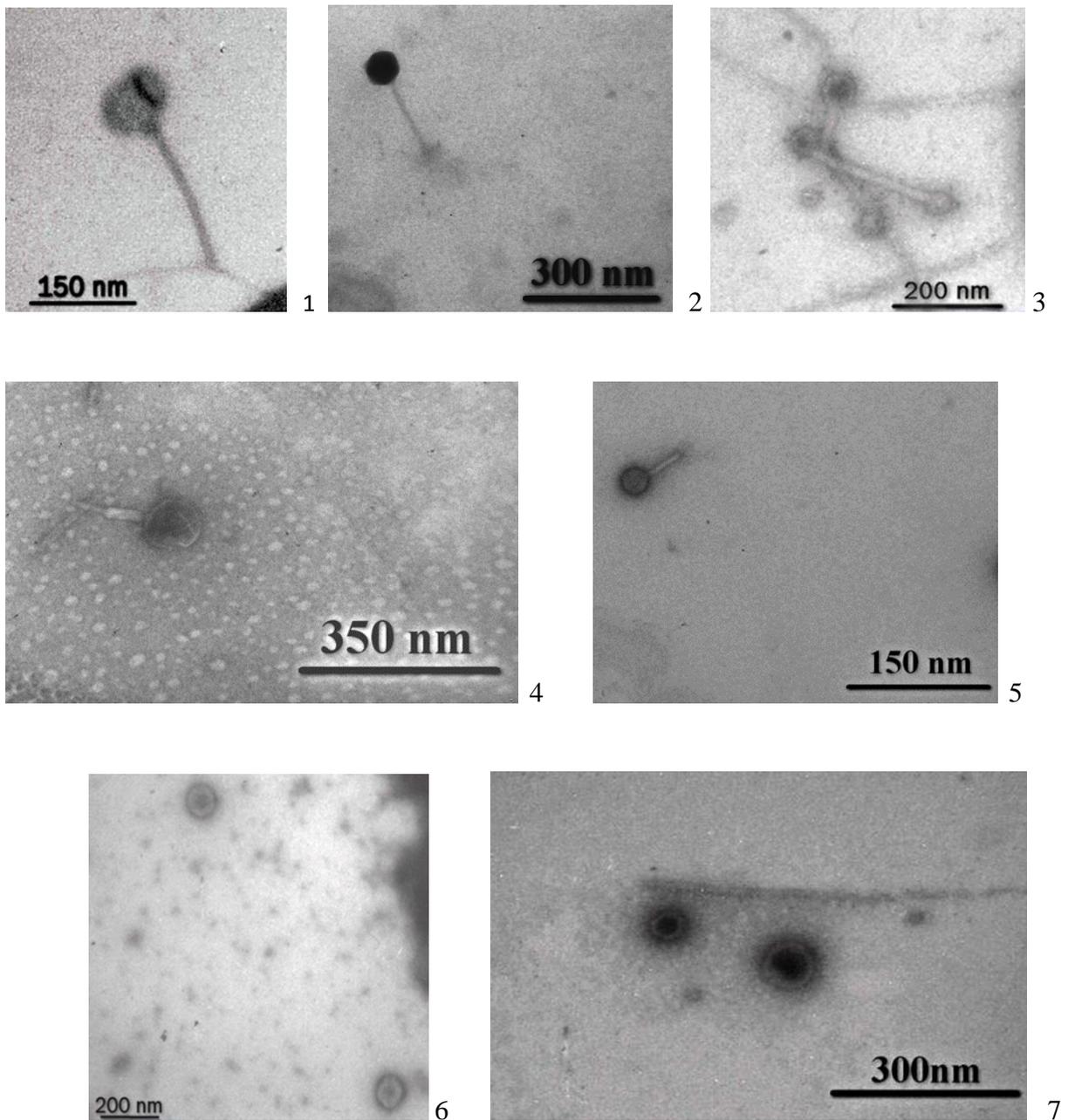


Рис. 3.10. Морфология фаговых частиц. 1, 2, 3 – *Siphoviridae*, 4, 5 – *Myoviridae*, 6, 7 – *Microviridae*.

На рисунке 3.10. показаны изображения фаговых частиц, полученные при изучении изолятов бактериофагов *E. amylovora* методом электронной микроскопии. Выделенные изоляты содержат фаговые частицы трех морфологических типов:

- 1) с длинным несокращающимся хвостом – представители семейства *Siphoviridae*;
- 2) с длинным сокращающимся хвостом – представители семейства *Myoviridae*;
- 3) сферические фаги, предположительно, представители семейства *Microviridae*.

Идентификация бактериофагов *E. amylovora* методом ПЦР. Известно, что наиболее консервативной частью геномов бактериофагов являются участки, кодирующие большие субъединицы терминаз, которые принимают участие в упаковке фаговой нуклеиновой кислоты в белковый капсид [95]. В 2004 году Serwer P. и др [205], предложили метод идентификации фагов посредством сравнения нуклеотидной последовательности генов, кодирующих большие субъединицы терминаз. На основе филогенетического дерева родства фагов, составленного Born et al., (2011) [69], а также с использованием данных о геномах фагов, имеющихся в генетическом банке [173], было проведено сравнение нуклеотидной последовательности больших субъединиц терминаз бактериофагов из групп M7 и L1. В таблице 3.4. представлены геномы бактериофагов, использованные для сравнения нуклеотидной последовательности генов, кодирующих большие субъединицы терминаз.

Таблица 3.4. Геномы бактериофагов группы M7 и L1, использованные для сравнения нуклеотидной последовательности генов, кодирующих большие субъединицы терминаз

Группа M7	Группа L1
<i>Myoviridae</i>	<i>Podoviridae</i>
phiEaM-M7,	phiT7
phiWV8	phiYeO3-12
phiEa104	phiEaP-L1
<i>Siphoviridae</i>	phigh-1
psiM2	phiSP6
	phiEra103

В таблице 3.4 указаны бактериофаги, информация о геномах которых была доступна на момент проведения опытов по идентификации выделенных бактериофагов *E. amylovora* методом сравнения участков геномов, кодирующих большие субъединицы терминаз.

Для амплификации последовательностей *tls* генов геномов фагов из групп M7 и L1 были подобраны дегенеративные пары праймеров *tlsM7F100/R500* и *tlsL1F180/R550*, соответственно. В таблице 3.5. представлены последовательности праймеров ПЦР, использованных для амплификации маркеров.

Таблица 3.5. Последовательности праймеров ПЦР, использованных для амплификации маркеров

№ праймера	Праймер	Последовательность нуклеотидов
1	tlsM7F100	5'-GTNCTNTAYGGNGGNGCNGCNGG-3'
2	tlsM7R500	5'-SWNGTNGCRTCNACYTGRTCRTC-3'
3	tlsL1F180	5'-ATHATHHTHGCNGAYGAYGTNGA-3'
4	tlsL1R550	5'-ANGCRTCNADNCKRTCRTCRTG-3'

Применение пары праймеров tlsL1F180/tlsL1R550 к фаговым лизатам, полученным нами, не дало никаких сигналов. В то же время, девять фаговых лизатов дали ПЦР продукт с парой праймеров tlsM7F100/tlsM7R500 размером более 1,2 kb, ожидаемый для вирусов группы M7. Такой же размер продукта ПЦР показал лизат миовируса phiEa104, использованный в качестве положительного контроля (рисунок 3.11).

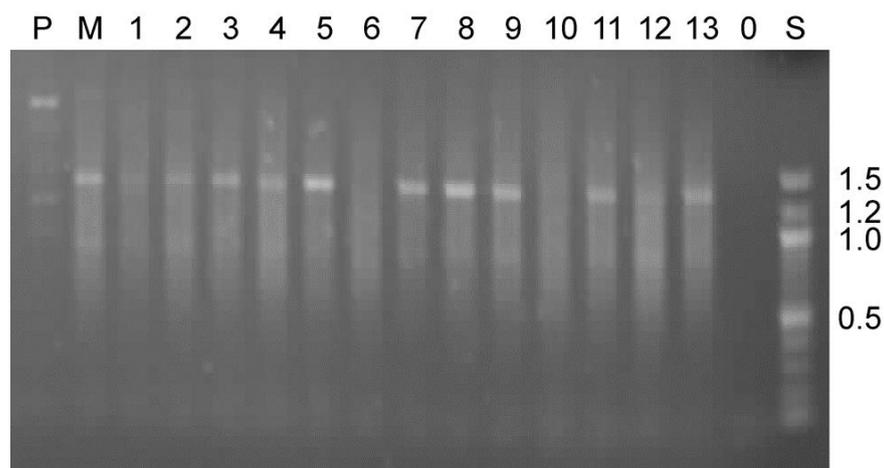


Рис. 3.11. Диагностическая ПЦР с использованием праймеров tlsM7F100/tlsM7R500. Линия P: phiEa1h (*Podoviridae*); линия M: phiEa104 (*Myoviridae*); линии 1-13: изоляты фагов, выделенные в Республике Молдова, нумерация в соответствии с таблицей 3.3; линия 0: отрицательный контроль; линия S: ДНК-маркер 100 пн (NEB), Размеры ПЦР продуктов (в kb) указаны справа.

Полученные результаты показывают, что фаги *E. amylovora* - представители групп L1 and M7 можно различить с использованием метода, основанного на применении *tls* маркера. Применение этого метода к фагам, собранным в Республике Молдова позволило идентифицировать вирусы группы M7 в девять из 13 фаговых лизатов. В то же время, в

исследованных образцах не выявлено ни одного фага представителя группы L1. Все образцы фагов, выделенные из почвы, были M7 положительными, тогда как в четырех из девяти образцов, собранных из кроны растений, пораженных бактериальным ожогом, не обнаружено ни одного фага из групп M7 и L1 [198].

Анализ образцов показал, что вид выделяемого фага, скорее всего, не зависит от растения-хозяина. В то же время известно, что выделение бактериофагов во многом зависит от методики их выделения. На репликацию фагов серьезное влияние оказывает питание и энергетический статус клетки-хозяина, pH, температура, наличие таких кофакторов, как Ca^{2+} или Mg^{2+} [236]. Более того, конечный продукт обогатившей жидкой культуры бактериофагов может содержать, главным образом, фаги, наиболее конкурентоспособные в данных условиях культивирования [205].

Известно, что под воздействием комплекса биотических и абиотических факторов в каждой экосистеме складывается свой состав микроорганизмов с определенными свойствами. Поскольку для изолирования фагов использовали бактерии *E. amylovora*, выделенные в Молдове, полное отсутствие фагов группы L1 может объясняться тем, что данные бактерии менее чувствительны к подовирусам по сравнению с фагами из группы M7, благодаря, например, тому, что они вырабатывают низкие количества ЭПС. В настоящее время хорошо известно, что адаптация вирусов к данному генотипу хозяина приводит к параллельной эволюции [115]. Об этом свидетельствуют опыты, проведенные в течение вегетационного сезона в системе «дерево-бактерия-фаг» с использованием природных бактериофагов, собранных в филлосфере конского каштана. Было убедительно доказано как влияние фагов на селекцию бактерий, так и влияние бактерий на селекцию в природных фаговых сообществах [137]. Одним из возможных результатов такой эволюционной динамики может быть формирование устойчивых региональных систем хозяин-патоген. Например, Gill et al. [108] сообщили, что, с очень небольшими исключениями, фаги семейства *Podoviridae* не были способны инфицировать вирулентные бактерии *E. amylovora*, изолированные в Британской Колумбии. Принимая во внимание этот факт, можно предположить, что в центральной части Республики Молдова сформировалась такая система фаг-бактерия, которая образована вирулентными бактериями *E. amylovora*, вырабатывающими низкое количество амиловорана и фагами группы M7, приспособленными к этим бактериям. Однако для достоверного подтверждения данного предположения необходимо провести опыты по изолированию фагов с использованием широкого круга накопительных культур бактерий, чтобы исключить вероятность того, что выявленная зависимость является методологическим артефактом.

О широкой степени гетерогенности изолятов бактериофагов свидетельствуют данные, полученные Müller et al. [172] при сравнении фагов из семейств *Podoviridae* и *Myoviridae*, собранных в Германии и Северной Америке. Авторы обнаружили, что бактериофаги существенно различаются по размеру геномов и молекулярным свойствам. Так, часть геномной последовательности фага phiEaJ08C (*Myoviridae*), выделенного в Германии, показала большое и слабое сходство с геномами американских миовирусов phiEa116 и phiEa104, соответственно. Более того, у немецких фагов из семейства *Podoviridae* phiEaJ08T и phiEaK08T отсутствовали или были слабыми сигналы для пары праймеров, подобранных для американского подовируса phiEa1h. Результаты, полученные в наших экспериментах, свидетельствуют об определенной степени гетерогенности бактериофагов, собранных в Республике Молдова. В частности, четыре из 13 фагов не были идентифицированы ни как представители группы M7, ни как представители группы L1.

Таким образом, несмотря на необходимость некоторых уточнений с использованием более доступных последовательностей геномов бактериофагов, диагностика бактериофагов на основе *tls* генов позволила идентифицировать девять из 13 изученных фагов *E. amylovora* как представителей группы вирусов M7. В эту группу входят вирусы из семейств *Myoviridae* и *Siphoviridae*. Считается, что представители этих семейств наиболее подходят для использования в качестве агентов биологической защиты от фитопатогенов.

Использование бактериофагов в качестве агентов биологической защиты от бактериального ожога. Сравнение фагов представителей семейств *Podoviridae* и *Myoviridae*, как потенциальных агентов в борьбе с бактериальным ожогом плодовых, которое провели Müller et al. [172] на цветках и незрелых плодах груши, показало, что подовирусы phiEa1h и phiEa100 оказывали незначительный эффект при подавлении роста *E. amylovora* на цветках. Эти фаги снижали численность бактерий на 40% по сравнению с контролем, в то время как миовирусы phiEa104 and phiEa116 снижали численность патогена на цветках яблони на 90%. В то же время, ни у подовирусов, ни у миовирусов не наблюдалось защитного эффекта на зеленых плодах груши. Обработка цветков яблони и зеленых плодов груши смесью фагов из семейств *Podoviridae* и *Myoviridae* совместно с инокуляцией патогеном не приводила к существенному различию в образовании симптомов поражения заболеванием по сравнению с обработкой только миовирусами. Однако, несмотря на отсутствие немедленного защитного эффекта, во избежание возникновения устойчивости бактерий-хозяев, применение смесей фагов должно быть приоритетным в разработке фаготерапии как средства борьбы с бактериальным ожогом. С учетом этих результатов, изученные нами вирусы, которые относятся к группе фагов M7

могут быть перспективными в качестве агентов биологического контроля бактериального ожога.

Целенаправленный поиск штаммов фагов, эффективных в полевых условиях, может быть важным элементом в развитии биологической борьбы с бактериальным ожогом. Worn et al. [68] считают, что удачной комбинацией для биологического контроля бактериального ожога может быть совместное использование фермента деполимеразы, продуцируемого фагом L1, и фага Y2 семейства *Myoviridae*, который поражает широкий круг бактериальных хозяев. Важным условием является поиск фагов, которые лучше всего приспособлены к данным условиям окружающей среды [127]. Ключевым элементом профилактики бактериального ожога является предотвращение ожога цветков [124]. *E. amylovora*-специфические бактериофаги подавляют рост бактерий *E. amylovora* на цветках [202]. Поэтому, разумным подходом к целенаправленному отбору фагов для борьбы с бактериальным ожогом является их выделение из кроны растений.

3.4. Выводы к главе 3

1. Из растений семейства *Rosaceae* с симптомами бактериального ожога выделены бактерии, которые по культурально-морфологическим признакам и способности индуцировать симптомы заболевания у растений-хозяев являются патогенными бактериями *Erwinia amylovora*.

2. Установлено, что бактериальный ожог плодовых может сдерживаться путем конкуренции микроорганизмов, ведущих борьбу за источники питания, а также присутствием в бактериальных популяциях специфических бактериофагов.

3. Изученные изоляты бактерии *E. amylovora*, выделенные из различных растений подсемейства *Prunoideae* существенно не отличаются по вирулентности и способности индуцировать реакцию гиперчувствительности.

4. Выделены 13 изолятов бактериофагов, которые способны лизировать вирулентные бактерии *E. amylovora*. Из изученных бактериофагов *E. amylovora* девять изолятов выделены из кроны растений, а четыре - из образцов почвы, взятых рядом с растениями. Установлено, что девять из 13 выделенных бактериофагов относятся к группе M7 (вирусы из семейств *Myoviridae* и *Siphoviridae*).

5. Все образцы фагов, выделенные из почвы и пять изолятов бактериофагов, выделенных из кроны растений, относятся к группе M7. В четырех из девяти образцов, взятых из кроны растений, пораженных бактериальным ожогом, не обнаружено ни одного фага из групп M7 и L1.

4. ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ *ERWINIA AMYLOVORA* В БОРЬБЕ С БАКТЕРИАЛЬНЫМ ОЖОГОМ ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР

4.1. Характеристика системы «бактериофаг *E. amylovora* – бактерия *E. amylovora* – растение-хозяин»

Важным элементом получения фаголизата с высоким титром бактериофагов является создание таких условий культивирования бактериофагов, при которых для данной системы «бактериофаг – бактерия-хозяин» достигается максимально возможный урожай фагов. Установлено, что способность бактериофагов инфицировать бактерии-хозяева зависит от многих факторов [205, 236]. Одним из существенных условий, которое влияет на выход фагов, является физиологическое состояние бактериального хозяина. Очевидно, что бактериофаги необходимо вносить в культуру бактерий-хозяев на такой фазе развития, когда они наиболее чувствительны к инфицированию фагами.

Известно, что в процессе роста бактериальной культуры в ограниченном объеме жидкой питательной среды, бактерии последовательно проходят 4 фазы роста: начальную фазу, фазу экспоненциального роста, фазу стационарного роста и фазу отмирания [38]. На начальной фазе роста (лаг-фаза), которая начинается с момента инокуляции бактериальных клеток в питательную среду, бактерии приспосабливаются к данной питательной среде и их число не увеличивается. Затем наступает фаза экспоненциального роста, когда бактерии активно размножаются и их число за единицу времени может увеличиваться почти в 2 раза. После того, как ресурсы питательной среды истощаются и становятся менее доступными, наступает фаза стационарного роста, при которой число бактерий не увеличивается. Когда количество бактерий становится настолько большим, что им не хватает строительных веществ питательной среды, наступает фаза отмирания, которая сопровождается уменьшением числа бактерий. Установлено, что наилучшая адсорбция фаговых частиц на клетки бактерий происходит в фазе экспоненциального роста бактериальной культуры [7, 38]. Следовательно, для получения фаголизата с высоким титром бактериофаги необходимо вносить в культуру бактерий на экспоненциальной фазе роста. Нами были проведены опыты по установлению времени, наступления экспоненциальной фазы роста бактерий *E. amylovora*, для чего была определена динамика роста бактерий *E. amylovora*. Динамику размножения бактерий *E. amylovora* в жидкой культуре (ЛБ бульон) изучали методом посева на плотную питательную среду (ЛБ агар, питательная среда С3). Чашки с питательной средой инкубировали 24 часа при температуре +28⁰С (рисунок 4. 1).

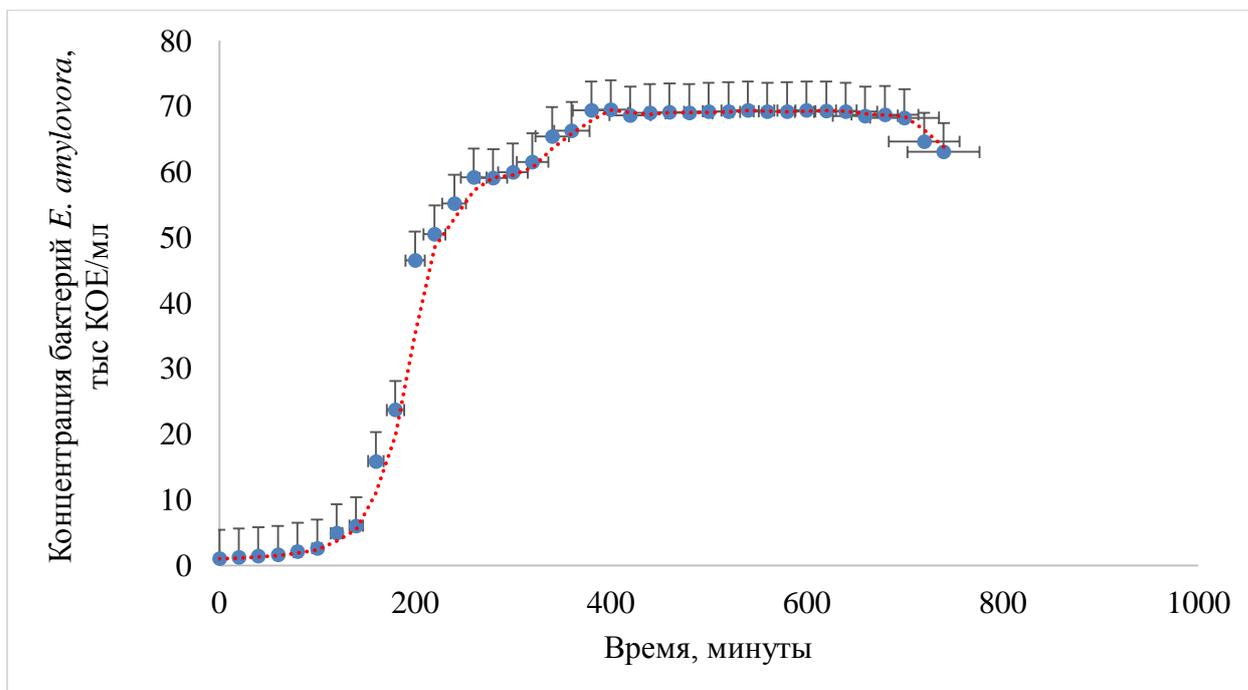


Рис. 4.1. Динамика размножения бактерий *E. amylovora* в жидкой культуре.

Как видно на рисунке 4.1, начальная фаза от инокуляции до активного роста (лаг-фаза) продолжалась около 100 минут. При этом число бактерий через каждые 20 минут увеличивалось примерно в 1,21 раз. Фаза экспоненциального роста началась после 140 минут культивирования и продолжалась 60 минут. Число бактерий в это время увеличивалось в среднем в 2,1 раза каждые 20 минут. Подсчет числа бактерий на плотной питательной среде через 200 минут после посева показал, что их рост в жидкой питательной среде был незначительным и в течение следующих 2 часов 40 минут количество бактерий увеличивалось в среднем в 1,05 раза. Дальнейшие наблюдения за ростом культуры бактерий показали, что с 360-ой до 620-ой минуты количество бактерий в культуре не увеличивалось, а с 640-ой минуты количество бактерий стало уменьшаться и к 720-ой минуте достигло 63,05 тыс. КОЕ/мл. Проведенный нами подсчет числа бактерий *E. amylovora* в жидкой питательной среде через 27 и 48 часов после инокуляции показал, что на плотной питательной среде выросло 32,12 тыс. КОЕ/мл и 8 тыс. КОЕ/мл, соответственно, что в 2,15 и 8,65 раз меньше, чем количество бактерий в стационарной фазе развития (69,2 тыс. КОЕ/мл).

Таким образом, проведенные нами опыты позволили определить, что у культивируемых бактерий *E. amylovora* в ЛБ бульоне при температуре +28⁰С лаг-фаза продолжается 100 минут, фаза экспоненциального роста начинается через 1 час 40 минут после инокуляции и продолжается 1 час 40 минут, затем рост количества бактерий

замедляется в течение 3 часов, после чего 4 часа 40 минут длится стационарная фаза роста бактерий. Через 10 часов 40 минут рост числа бактерий замедляется, а через 27 часов количество бактерий в жидкой культуре значительно уменьшается, что свидетельствует о том, что бактериальная культура находится в фазе отмирания. То есть, для получения фаголизата с высоким титром, при данных условиях культивирования следует вносить бактериофаги через 1 час 40 минут – 3 часа 20 минут с начала роста бактерий.

Известно, что для использования бактериофагов в фаготерапии необходимо знать минимальную концентрацию бактериофагов, которые способны лизировать клетки патогена. Schnabel, E. L. и Jones, A. L. [202] выделили фаг ФЕa116С, который на 95% уменьшал титр жидкой культуры Ea110 бактерии *E. amylovora* при добавлении 1 БОЕ /мл фага на 10 КОЕ /мл бактерии. В связи с этим была проведена серия опытов, чтобы определить минимальное количество бактериофагов, которое требуется для осуществления лизиса бактерий при выбранных условиях культивирования, Фаголизат (изолят бактериофагов 605фСу1- а) добавляли в культуру бактерий *E. amylovora* с момента начала роста бактерий в жидкой питательной среде до вступления бактерий в стационарную фазу роста. Титр бактерий и бактериофагов подбирали так, чтобы на 1 бактериальную клетку приходилось около 7 фаговых частиц (рисунок 4.2).

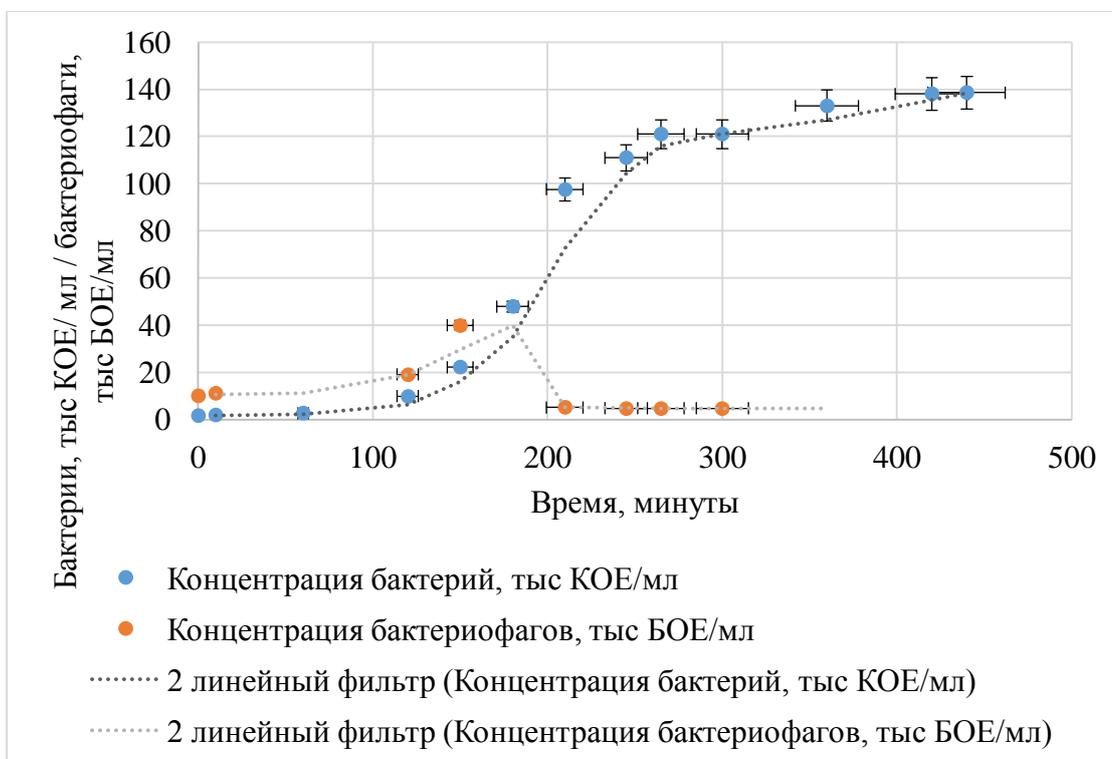


Рис. 4.2. Лизис бактерий *E. amylovora* бактериофагами при различных концентрациях бактерий.

Как видно на рисунке 4.2, на начальной фазе роста бактерий фаги образовывали на бактериальном газоне стерильные пятна в соотношении 1 КОЕ бактерий на 7 БОЕ бактериофагов. Через 2 часа после посева смеси бактерий, вступивших в экспоненциальную фазу роста, и бактериофагов, на бактериальном газоне было 2 стерильных пятна на 1 колонию бактерий. В экспоненциальной фазе роста бактерий на бактериальном газоне бактериофаги формировали стерильные пятна в соотношении 2 БОЕ/мл фагов к 1 КОЕ/мл бактерий. При переходе бактериальной культуры в стационарную фазу роста, когда на 1 БОЕ/мл фагов приходилось 18,8 КОЕ/мл бактерий *E. amylovora*, негативные колонии на бактериальном газоне проявлялись через 48 часов после посева.

В целом, проведенный опыт показывает, что при использованном способе культивирования для приготовления фаголизата, который можно использовать против возбудителя бактериального ожога плодовых, лучше всего вносить бактериофаги в культуру бактерий не позже, чем через 3 часа с момента посева бактерий в питательную среду. В то же время установлено, что фаги способны лизировать бактерии даже если на 1 фаговую частицу приходится 25 бактериальных клеток, хотя им требуется на это больше времени, чем при более высокой концентрации фаговых частиц.

В нашем опыте взаимодействие фагов и бактерий происходило в контролируемых условиях с ограниченным количеством питательных веществ. Можно предположить, что при внесении бактериофагов в открытую систему «растение-хозяин - патоген», которая развивается в естественных условиях, даже 1 фаговой частицы на 25 бактериальных клеток может оказаться достаточно для того, чтобы оказывать влияние на развитие патогенных бактерий *E. amylovora* в тканях растений-хозяев.

Сезонная динамика выделения бактериофагов *E. amylovora* из плодовых в период вегетации. Применение фаготерапии в защите многолетних плодовых культур осложняется тем, что, в отличие от ризосферы, филлосфера подвержена гораздо более жесткому воздействию абиотических факторов и потому является достаточно агрессивной средой для микроорганизмов. Резкие колебания температуры и влажности, длительное воздействие низких температур в холодные месяцы года и высоких - в летние, а также продолжительные засушливые периоды обуславливают особенности жизнедеятельности микроорганизмов обитателей кроны деревьев. Сезонные изменения температуры и влажности воздуха обуславливают смену фаз развития растения, а значит и изменение химического состава тканей растений – мест обитания микроорганизмов. Поэтому успешное выживание микроорганизмов, обитающих в кроне деревьев, связано не только с их взаимным влиянием друг на друга, но и способностью приспосабливаться к среде обитания.

Необоснованная обработка бактериофагами является не только неэффективным расходом препарата на основе бактериофагов, но и может привести к тому, что бактериофаги, попав в среду с недостаточным количеством патогенных бактерий-хозяев могут частично изменить спектр литического действия и приспособиться к инфицированию других бактерий – обитателей филлосферы. Это, в свою очередь, может привести к уменьшению в филлосфере микроорганизмов, способных конкурировать с патогенными бактериями за источники питания. Кроме того, несбалансированное использование бактериофагов может спровоцировать ускоренный отбор устойчивых патогенных бактерий.

Чтобы не проводить неэффективные обработки, важно знать особенности природных популяций фагов. Известно, что бактериофаги подвержены сезонным колебаниям концентрации. Так, опыты с фагами, инфицирующими ризосферные бактерии на посевах сахарной свеклы, показали, что в теплый период года титры фагов были выше, чем в холодные месяцы года. При этом, как правило, в течение всего периода исследований полная инактивация бактериофагов не наблюдалась [39].

Для изучения особенностей развития фагов в кроне плодовых в 2007 г. был проведен сравнительный анализ сезонной динамики концентрации бактериофагов *E. amylovora* в тканях растений-хозяев. Для этого из кроны яблони летнего сорта «Слава победителям», зимнего сорта «Джонатан» и из груши каждый месяц в течение вегетационного сезона отбирали пробы для тестирования на наличие бактериофагов *E. amylovora*. Для тестирования отбирали распускающиеся почки (середина апреля), цветы и молодые побеги (май) и побеги с листьями в период с июня по октябрь. Фаги определяли по морфологии колоний, скорости формирования колоний на бактериальном газоне и с помощью электронного микроскопа. Использовалась накопительная культура бактерий *E. amylovora* с титром 3×10^7 КОЕ/мл.

На рисунках 4.3 и 4.4. представлена концентрация бактериофагов в тканях плодовых и данные о средней месячной температуре и среднем количестве осадков в период проведения опыта по изучению динамики концентрации бактериофагов в тканях плодовых в естественных условиях.

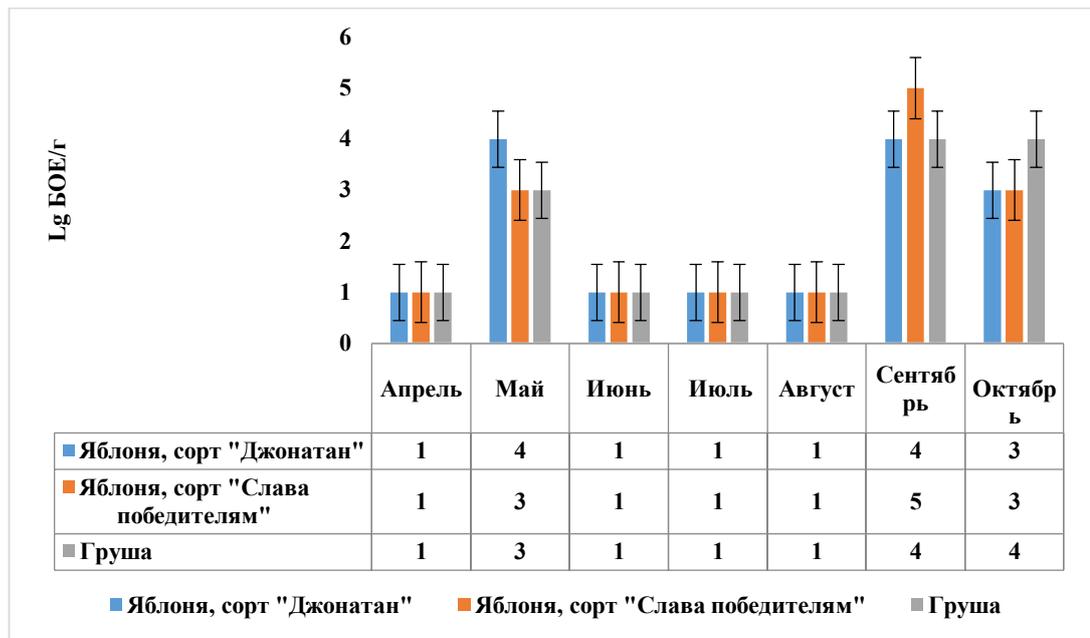


Рис. 4.3. Концентрация бактериофагов (изоляты 503фМ2-а и 503фР5-а) в течение вегетационного сезона в кроне яблони сорт «Джонатан», сорт «Слава победителям», груши, ИЗРЭЗ, 2007 г.

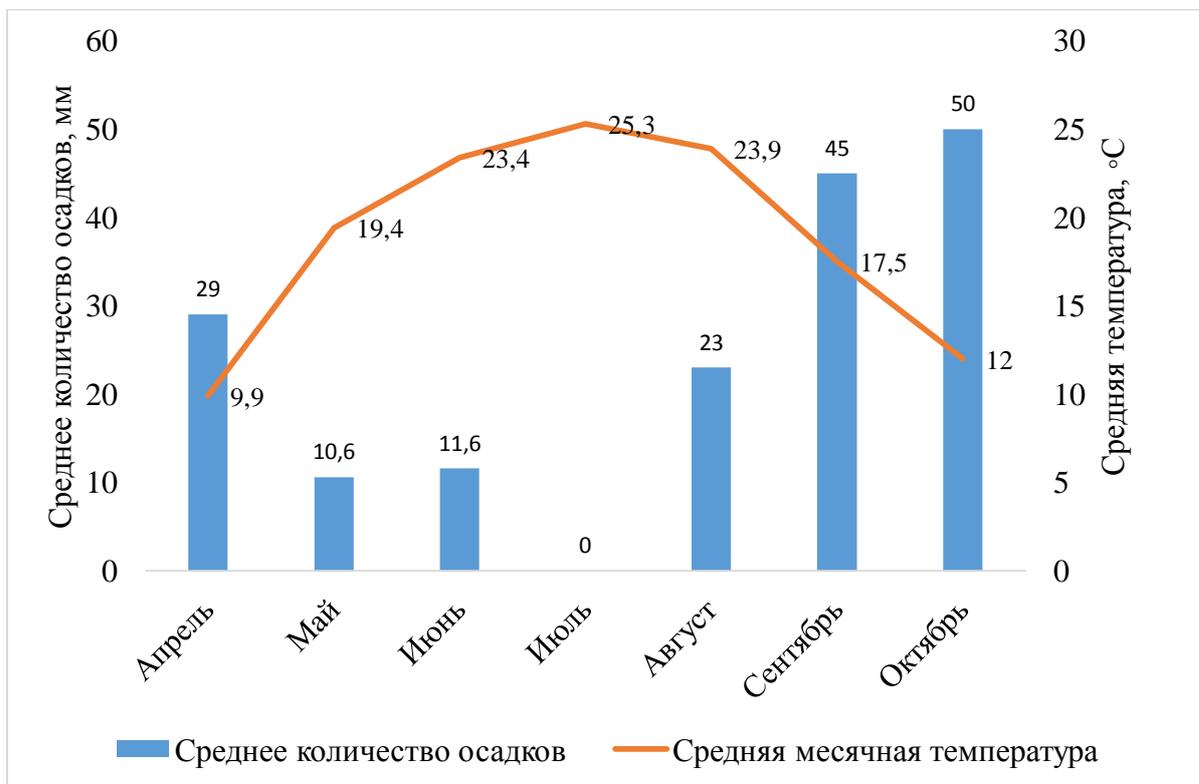


Рис. 4.4. Среднемесячные температура и количество осадков в период проведения опыта, 2007 г. [3].

На рисунке 4.3. видно, что в апреле в период набухания и распускания почек концентрация бактериофагов в тканях невысокая, хотя средняя температура составила $+9,9^{\circ}\text{C}$, а количество осадков было 29 мм (рис. 4.4). К началу мая, в период цветения при небольшом количестве осадков (10,6 мм) и среднемесячной температуре $+19,4^{\circ}\text{C}$, концентрация фагов в тканях растений заметно увеличилась и составила 10^4 БОЕ/г в тканях яблони сорта «Джонатан» и по 10^3 в тканях яблони сорта «Слава победителям» и в тканях груши. В июле средняя температура воздуха достигала $25,3^{\circ}\text{C}$, а сумма осадков за период май-июль составляла 45- 145 мм (25-65% нормы), а местами – 175-268 мм (80-115% нормы). При этом в июле осадков не выпадало, то есть лето 2007 г. было особенно сухим. Количество осадков за сезон в республике составило 62-170 мм, или 35-80% нормы. Общая продолжительность дней без дождя за теплый период (апрель-октябрь) в северной половине республики составила 40-110 дней, в южной – 92-133 дней. Наибольшая непрерывная продолжительность периода без дождей была 20-40 дней, что наблюдается в среднем один раз в 20 лет.

Проведенные нами наблюдения и подсчеты показали, что в период с июня по август в условиях низкой влажности и высокой температуры, концентрация бактериофагов была крайне низкой и составила порядка 10 БОЕ/г на всех опытных растениях.

В сентябре, когда температура воздуха понизилась до $17,5^{\circ}\text{C}$, а количество осадков возросло до 45 мм в месяц, концентрация бактериофагов повысилась до 10^5 БОЕ/г и 10^4 БОЕ/г.

В октябре, при средней температуре воздуха 12°C и среднем количестве осадков 50 мм, концентрация бактериофагов в тканях растений понизилась до 10^3 БОЕ/г в тканях зимнего и летнего сортов яблони и до 10^4 БОЕ/г в тканях груши.

Следует отметить, что по данным Государственной метеорологической службы [3], 2007 год на территории Республики Молдова был самым теплым за последние 120 лет. Впервые в истории метеорологических наблюдений отмечался самый теплый период зима – весна – лето. Средняя годовая температура воздуха превысила климатическую норму на $2-2,6^{\circ}\text{C}$. Средняя температура воздуха за зиму – весну– лето превысила норму на $3-3,5^{\circ}\text{C}$. Количество выпавших осадков за год составило 400-610 мм, или 80-125 % нормы. Таким образом, высокий температурный режим и значительный недобор осадков в мае-июле способствовали возникновению сильной засухи.

Итак, результаты проведенного исследования показали, что в естественных условиях концентрация бактериофагов в тканях растений подвержена сезонному колебанию и зависит, главным образом, от условий температуры. По результатам проведенного опыта установлено, что порода растения не оказывает влияния на концентрацию бактериофагов в тканях растений-хозяев.

Сезонная динамика концентрации бактериофагов в тканях растений-хозяев в естественных и искусственных условиях. В 2009 было изучено сезонное изменение концентрации бактериофага 502фCr1-а в тканях природного растения-хозяина боярышника в открытом грунте и в тканях опытного растения айвы в условиях вегетационного опыта в лаборатории. Бактериофаги 502фCr1-а были выделены из природного растения-хозяина, пораженного бактериальным ожогом. В сентябре 2008 года в условиях вегетационного опыта в лаборатории опытные растения (подвои айвы) были заражены патогеном и обработаны фагом 502фCr1-а. Определение концентрации бактериофагов в тканях растений в лаборатории и в природе проводили с января по октябрь 2009 года.

На рисунке 4.5. представлены данные о количестве изолята бактериофагов 502фCr1-а в тканях айвы при искусственном заражении и в тканях боярышника, растущего в естественных условиях в зависимости от средней месячной температуры и среднего количества осадков (рис.4.6).

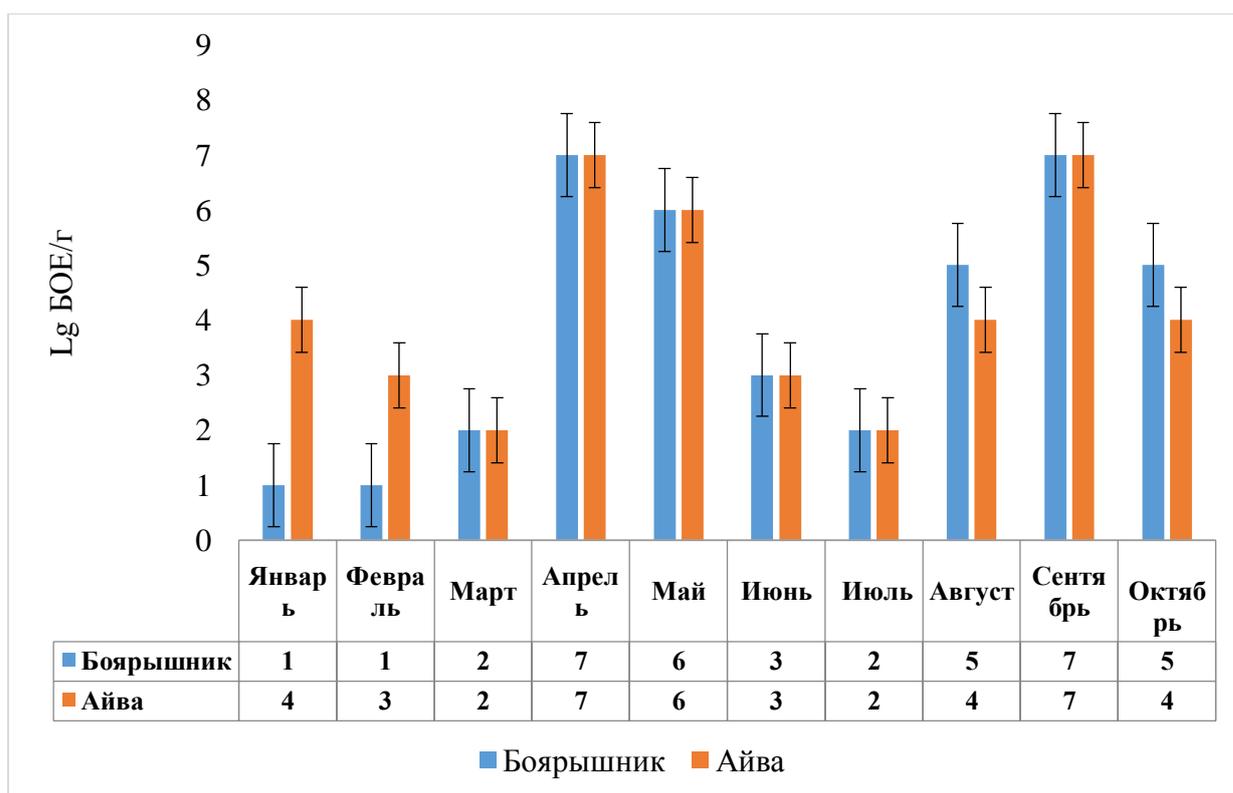


Рис. 4.5. Концентрация изолята 502фCr1-а бактериофагов в тканях айвы (искусственное заражение изолятом 502фCr1-а) и боярышника (естественные условия), 2009 г.

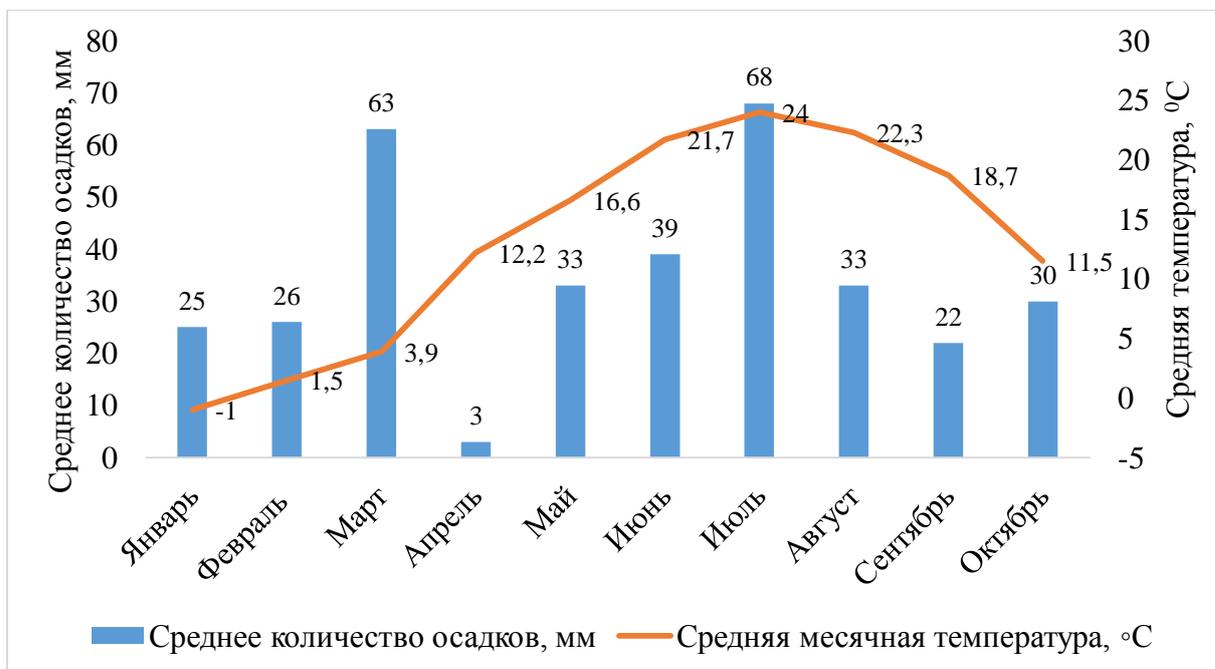


Рис. 4.6. Погодные условия в период наблюдений 2009 г. [5]

На рисунке 4.5 видно, что в начале опыта в январе концентрация бактериофагов 502фCr1-а в тканях растений в естественных условиях была в 1000 раз меньше, чем в тканях растений в лаборатории и составила 10 БОЕ/г. Средняя температура воздуха зимой в естественных условиях была такой же, как и та, при которой содержались опытные растения в лаборатории и составила -1°C в январе, $+1,5^{\circ}\text{C}$ в феврале. При этом концентрация бактериофагов в тканях опытных растений в естественных условиях и в условиях лаборатории в январе составила 10 БОЕ/г и 10^4 БОЕ/г, соответственно.

В феврале, при одинаковых режимах температуры и влажности концентрация бактериофагов в лаборатории уменьшилась в 10 раз, а в естественных условиях концентрация фагов в тканях растений не изменилась по сравнению с январем.

В марте, при средней температуре воздуха $+3,9^{\circ}\text{C}$ и среднем количестве осадков 63 мм в естественных условиях концентрация бактериофагов в тканях растений в естественных условиях и в лаборатории была одинаковой и составила 10^2 БОЕ/г.

Т. е, в тканях боярышника в естественных условиях концентрация бактериофагов увеличилась по сравнению с январем и февралем, в то время как в тканях растений в лаборатории, концентрация бактериофагов уменьшалась.

В апреле, в период распускания листьев и при средней температуре воздуха $+12,2^{\circ}\text{C}$, но с небольшим количеством осадков (3 мм) концентрация бактериофагов в тканях растений-хозяев как в естественных условиях, так и в лаборатории стала увеличиваться и составила 10^7 БОЕ/г в обоих вариантах.

В мае, при средней температуре воздуха $+16,6^{\circ}\text{C}$ и среднемесечном количестве осадков 33 мм концентрация бактериофагов в естественных условиях и в лаборатории уменьшилась в 10 раз по сравнению с апрелем и составила 10^6 БОЕ/г.

В июне при средней температуре $+21,7^{\circ}\text{C}$ и среднем количестве осадков 39 мм концентрация бактериофагов в тканях опытных растений как в природных условиях, так и в условиях лаборатории резко понизилась и составила 10^3 БОЕ/г.

В июле концентрация бактериофагов в тканях растений хозяев продолжала уменьшаться и составила 10^2 БОЕ/г. При этом средняя температура воздуха в июле повысилась по сравнению с июнем и составила $+24^{\circ}\text{C}$. Среднее количество осадков, однако увеличилось (68 мм).

В августе температура несколько понизилась и составила $+22,3^{\circ}\text{C}$ при среднем количестве осадков 33 мм. В этих условиях концентрация бактериофагов в тканях растений увеличилась и составила 10^5 БОЕ/г и 10^4 БОЕ/г в тканях естественного хозяина и в тканях растения-хозяина в условиях лаборатории, соответственно.

В сентябре при средней месячной температуре $+18,7^{\circ}\text{C}$ и среднем месячном количестве осадков 22 мм концентрация бактериофагов продолжила повышаться и достигла апрельского максимума 10^7 БОЕ/г в обоих вариантах.

В октябре, когда средняя температура воздуха составила $+11,5^{\circ}\text{C}$, а среднее количество осадков было 30 мм, концентрация бактериофагов в опытных растениях стала понижаться и составила 10^5 БОЕ/г и 10^4 БОЕ/г в тканях естественного хозяина и в тканях растения-хозяина в условиях лаборатории, соответственно.

По сведениям Государственной метеорологической службы Республики Молдова, [3] 2009 год по температурному режиму занял второе место среди теплых лет за весь период инструментальных наблюдений после 2007 года. Зимой (2008-2009 гг.) средняя за сезон температура воздуха была на $1,8-3,1^{\circ}\text{C}$ выше нормы. Количество выпавших осадков за сезон составило 75-145 мм, или 85-150% нормы. Средняя температура воздуха за год составила по территории $9,6-11,8^{\circ}\text{C}$ тепла, что на $1,2-2,0^{\circ}\text{C}$ выше нормы. Весной средняя температура воздуха была теплее обычного на $0,6-1,6^{\circ}\text{C}$. При этом на большей части территории отмечался недобор осадков. Их количество за сезон составило 65-90 мм, или 50-75% нормы. Лето было жарким и с недобором осадков. Средняя за сезон температура воздуха была на $1,1-2,2^{\circ}\text{C}$ выше нормы. Количество выпавших осадков за сезон составило всего 68-170 мм (36-80% нормы). Осень была очень теплой и с недобором осадков. Средняя температура воздуха за сезон была на $1,9-2,5^{\circ}\text{C}$ выше нормы. Количество осадков за сезон составило 44-85 мм, или 37-75% нормы.

Известно, что высокие температуры способствуют инактивированию бактериофагов [127] и изменяют свойства бактерий-хозяев. Friman V-P., et al. показали, что температура усиливает патогенность бактерий рода *Shigella* и *Legionella pneumophila*. А при изучении влияния высокой температуры и бактериофагов на изменение патогенности бактерий в системе «бактерия *Serratia marcescens* - фаг PPV (*Podoviridae*)» было установлено, что при температуре +37⁰С у бактерий *Serratia marcescens* усиливалась подвижность и способность формировать биопленки. В то же время фагоустойчивые бактерии обладали меньшей вирулентностью. То есть температура может способствовать отбору более вирулентных бактерий, а фаги могут сдерживать этот эффект [101]. Однако перечисленные бактерии, как правило, не обитают в кроне растений и оптимальные температурные условия окружающей среды для этих бактерий выше, чем для бактерий – обитателей кроны.

Анализ полученных данных по сезонному колебанию концентрации бактериофагов с учетом климатических условий, сложившихся в период проведения опытов позволяет предположить, что при достаточно комфортных для развития патогена температуре и влажности, но при неподходящем физиологическом состоянии растений, концентрация фагов уменьшается. Это наблюдалось в октябре при средней температуре воздуха +12⁰С и +11,5⁰С в 2007 и 2009 гг., соответственно, и при среднем количестве осадков 50 мм и 30 мм в эти же годы, соответственно, концентрация бактериофагов уменьшалась, поскольку начиналось опадение листьев у растений-хозяев и, следовательно, внутренняя среда растений была неблагоприятна для роста бактерии-хозяина. В то же время в мае 2007 года, когда абиотические условия для роста микроорганизмов были не самые благоприятные (среднемесячная температура +19,4⁰С и среднее количество осадков 10,6 мм), физиологическое состояние растений-хозяев, которые находились в то время в фазе цветения и роста молодых побегов, скорее всего, способствовало тому, что концентрация бактериофагов в естественном биоценозе плодового сада была самой высокой в весенне-летний период и составила от 10³ БОЕ/г до 10⁴ БОЕ/г.

Следовательно, результаты проведенных опытов показывают, что концентрация бактериофагов в тканях растений-хозяев как в естественных популяциях, так и при обработке фагами растений в условиях лаборатории, зависит от температуры и влажности окружающей среды, а также от физиологического состояния растения-хозяина. При этом не выявлена связь между концентрацией бактериофагов в тканях растений-хозяев и видовой принадлежностью растений-хозяев, из тканей которых изолировали бактериофаги.

4.2. Применение бактериофагов *E. amylovora* в борьбе с бактериальным ожогом плодовых культур

В настоящее время фаготерапия рассматривается в качестве альтернативы антибиотикам и химическим средствам борьбы с бактериозами и, в частности, с бактериальным ожогом плодовых [70,181].

Нами была проведена серия опытов, где изоляты бактериофагов, выделенные из боярышника (Б/ф 1 502фCr1-а), айвы (Б/ф 2 605фСу1-а) и вишни войлочной (Б/ф 3 511фСе1-а) были испытаны в подавлении роста вирулентных изолятов бактерий *E. amylovora* на растениях-хозяевах в условиях лаборатории и в условиях полевого опыта.

Эффективность бактериофагов в подавлении роста *E. amylovora* в условиях лаборатории на зеленых плодах груши. В лаборатории эффективность бактериофагов в подавлении роста патогенных бактерий *E. amylovora* оценивали путем заражения зеленых плодов груши суспензией бактерий *E. amylovora* с последующей обработкой бактериофагами. Контролем служили зеленые плоды груши, обработанные дистиллированной водой. В качестве критерия угнетения роста патогенных бактерий *E. amylovora* под воздействием бактериофагов использовали стандартный показатель: отсутствие на зеленых плодах груши характерного для этого бактериоза молочно-белого экссудата (рисунок 4.7). Опыт проводился во влажной камере при температуре +28⁰С.



Рис. 4.7. Действие бактериофагов на бактерии *E. amylovora* при инокуляции зеленых плодов груши (Б/ф 1 502фCr1-а, Б/ф 2 605фСу1-а, Б/ф 3 511фСе1-а).

Как видно на рисунке 4.7, на зеленых плодах груши, зараженных возбудителем бактериального ожога и обработанных бактериофагами, после 6 суток инкубации отсутствовал экссудат, и образцы практически не отличались от обработанных дистиллированной водой (контроль). В то же время на зеленых плодах груши, зараженных бактериями *E. amylovora* уже через 48 часов инкубирования было зафиксировано проявление отличительного симптома заболевания бактериальным ожогом – молочно-белого, а позже молочно-коричневого экссудата [35,36].

То есть, результаты исследования биологической эффективности бактериофагов *E. amylovora* в лаборатории подтвердили, что фаги могут подавлять рост патогенных бактерий *E. amylovora*.

Влияние бактериофагов на развитие патогена в тканях растений-хозяев в контролируемых условиях влажности и температуры. Известно, что рост патогена зависит от средней температуры и влажности окружающей среды. Верхний температурный предел, при котором могут расти некоторые штаммы бактерии *E. amylovora* составляет +39⁰С. Оптимальной для роста патогена является температура +28⁰С [189] при влажности не менее 80%. Авторы показали, что симптомы заболевания при поражении цветков проявляются только при наличии осадков в период попадания патогена на пестики цветков, т.к. именно осадки способствуют передвижению бактерий по столбику пестика в гипантий [94].

Кроме того, известно, что при искусственном заражении растений немаловажным фактором является способ инокуляции патогена. От метода, использованного для внесения патогена в ткани растения зависит скорость и интенсивность развития болезни, а также степень проявления симптомов заболевания. Установлено, что местная инфильтрация суспензии патогена в мезофилл листа вызывала раннее начало проявления симптомов, но болезнь развивалась медленно. В то время как на листьях, проколотых зажимами, симптомы заболевания развивались позже, но проявлялись гораздо быстрее. Инокуляция кисточкой вызывала средний инкубационный период, среднюю степень развития болезни, но при этом болезнь развивалась быстро. В листьях, инокулированных путем срезания ножницами, симптомы бактериального ожога развивались рано, быстро. При этом был отмечен самый высокий уровень развития болезни, а для развития симптомов болезни требовалась наименьшая средняя эффективная доза патогена [197].

Для проверки действия патогенных бактериями *E. amylovora* на развитие симптомов бактериального ожога у растений-хозяев нами был проведен опыт по обработке побегов опытных растений суспензией бактерий *E. amylovora* в контролируемых условиях (рисунок 4.8).

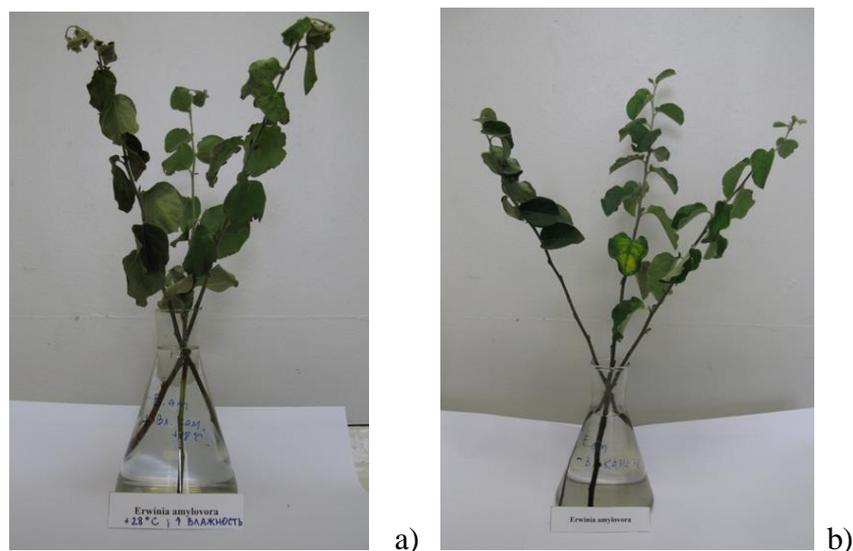


Рис. 4.8. Проявление симптомов заболевания бактериальным ожогом на черенках айвы: а) температура $+28^{\circ}\text{C}$, высокая влажность; б) температура $+18^{\circ}\text{C}$, низкая влажность.

Оказалось, что при контрольной инокуляции суспензии бактерий *E. amylovora* уколom в верхние листья при температуре $+28^{\circ}\text{C}$ в условиях высокой влажности на инокулированных патогеном черенках подвоев айвы развивался характерный симптом бактериального ожога – усохшая в виде крючка верхушка (рис. 4.8.а). В то время как при температуре $+18^{\circ}\text{C}$ при низкой влажности симптомы заболевания не проявлялись или проявлялись слабо (рис. 4.8 б).

Тот же эффект наблюдался при инокуляции суспензией бактерий *E. amylovora* верхушечных листьев груши (рисунок 4.9). Контролем служили верхушечные листья, инокулированные стерильной дистиллированной водой.

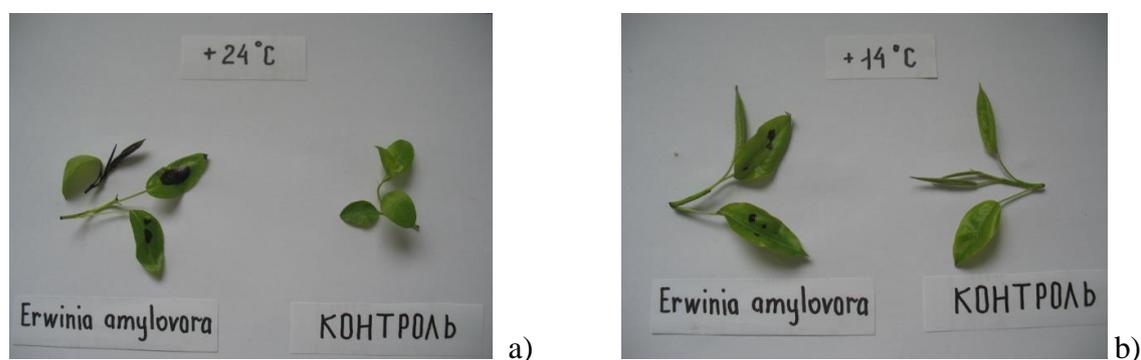


Рис.4.9. Проявление симптомов поражения бактериальным ожогом на верхушечных листьях груши: а) температура $+24^{\circ}\text{C}$, высокая влажность; б) температура $+14^{\circ}\text{C}$, низкая влажность.

На рисунке 4.9 видно, что при температуре $+24^{\circ}\text{C}$ и высокой влажности на верхушечных листьях груши, инокулированных суспензией бактерий *E. amylovora*, наблюдалась интенсивная некротизация тканей (рис. 4.9, а). В то время, как на листьях груши, инокулированных суспензией бактерий *E. amylovora*, которые находились в условиях низкой температуры и влажности, некротизация тканей была очень слабой.

Итак, было показано, что при искусственном заражении черенков айвы и молодых побегов груши патогенными бактериями *E. amylovora* симптомы бактериального ожога развиваются при высокой температуре ($+24^{\circ}\text{C}$ и $+28^{\circ}\text{C}$) и высокой влажности. Тогда как в условиях низкой температуры ($+14^{\circ}\text{C}$ и $+18^{\circ}\text{C}$) и низкой влажности на опытных растениях, инфицированных патогенными бактериями *E. amylovora*, симптомы бактериального ожога не проявляются или проявляются очень слабо.

Для проверки действия бактериофагов на развитие патогена в тканях растений-хозяев нами был проведен опыт по обработке побегов опытных растений бактериофагами в контролируемых условиях (рисунок 4.10). На рисунке 4.10. показано действие бактериофагов при инокуляции суспензии бактерий *E. amylovora* уколком в верхние листья с последующей обработкой фаголизатом при температуре $+28^{\circ}\text{C}$ в условиях влажной камеры и при температуре $+18^{\circ}\text{C}$ при низкой влажности.



Рис. 4.10. Действие бактериофагов на развитие бактериального ожога на черенках айвы а) температура $+28^{\circ}\text{C}$, высокая влажность; б) температура $+18^{\circ}\text{C}$, низкая влажность.

Обработка фаголизатом зараженных бактериями *E. amylovora* черенков айвы при температуре $+28^{\circ}\text{C}$ в условиях повышенной влажности приводила к ослаблению активности патогена. Так, на черенках, обработанных бактериофагами, симптомы

поражения бактериальным ожогом проявились слабо (рис. 4.10 а) по сравнению с черенками, зараженными только бактериями *E. amylovora*, которые находились в аналогичных условиях (рисунок 4.8 а). В то же время на черенках, которые находились при температуре +18⁰С в условиях низкой влажности, не наблюдалось ни действие патогена на растение, ни воздействие бактериофагов на патоген.

При этом интенсивность развития бактериального ожога в варианте, где черенки подвоев айвы были заражены патогенным изолятом бактерии *E. amylovora*, существенно различалась от интенсивности развития болезни в вариантах, где черенки были заражены патогенным изолятом бактерии *E. amylovora*, а затем обработаны фаголизатами 605фCy1-а и 502фCr1-а (рисунок 4.11).

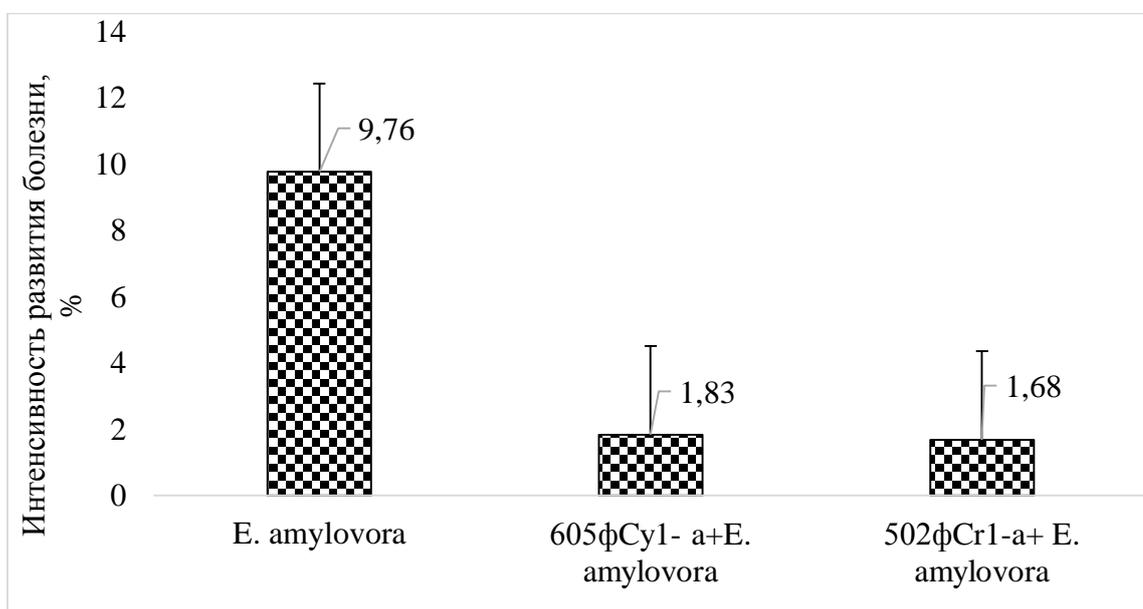


Рис. 4.11. Влияние бактериофагов на интенсивность развития бактериального ожога при температуре +28⁰С в условиях повышенной влажности.

По данным, полученным в опытах и представленным на рисунке 4.11, видно, что интенсивность развития бактериального ожога на растениях, зараженных бактериями *E. amylovora* и обработанных фаголизатами, была существенно меньше, чем у растений, зараженных возбудителем бактериального ожога.

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что в условиях, благоприятных для развития патогена, при обработке фагами побегов, зараженных патогеном, на них отсутствуют характерные симптомы заболевания. В то время, как на побегах, не обработанных фагами, симптомы заболевания четко проявлялись.

Оценка влияния бактериофагов на развитие саженцев яблони в лабораторных условиях. Поскольку было установлено, что бактериофаги способны сдерживать проявление симптомов бактериального ожога на отдельных органах растений, был проведен опыт по изучению влияния бактериофагов на развитие бактериального ожога на растениях, произрастающих в вегетационных сосудах в условиях лаборатории. Для определения влияния бактериофагов на развитие пораженных бактериальным ожогом растений проведено искусственное заражение саженцев яблони, бактериями *E. amylovora* и обработка их бактериофагами. Опыт проводили в следующих вариантах: 1) заражение бактериями *E. amylovora*; 2) заражение бактериями *E. amylovora* с последующей обработкой бактериофагами *E. amylovora*. Контролем служили саженцы яблони, обработанные дистиллированной водой. В период цветения проводили искусственное опыление растений. Учитывалось наличие симптомов заболевания и общее состояние растений на разных стадиях развития в течение вегетационного сезона. В каждом из вариантов было по 8 растений.

В таблице 4.1 приведены результаты проведенных экспериментов по изучению влияния бактериофагов *E. amylovora* на развитие бактериального ожога на саженцах яблони, искусственно зараженных патогенными бактериями *E. amylovora*

Таблица 4.1. Развитие саженцев яблони, обработанных *E. amylovora* и бактериофагами *E. amylovora*

Показатель	Варианты		
	<i>E. amylovora</i>	<i>E. amylovora</i> + бактериофаги	Инъекция дистиллированной водой
Цветение	+	+	-
Образование завязи	-	+	-
Образование плодов	-	-	-
Распространенность заболевания, %	100%	25%	0%
Биологическая эффективность		75%	

Наблюдения за саженцами яблони в опыте проводились в течение 3-х вегетационных сезонов: с 2007- 2009 гг. Отмечено, что цветение раньше и обильнее было у растений, зараженных бактериями *E. amylovora* и обработанных бактериофагами *E. amylovora*. В контроле растения не цвели. Образование завязей наблюдалось только на растениях, обработанных *E. amylovora* и бактериофагами. Листовой аппарат у растений, в варианте с обработкой бактериофагами был также развит значительно лучше.

Симптомы поражения бактериальным ожогом на саженцах яблони, искусственно зараженных патогенными бактериями *E. amylovora*, проявились только на 3-й год опытов, хотя ежегодное тестирование подтверждало наличие патогенного изолята *E. amylovora* и бактериофагов *E. amylovora* в тканях опытных растений. На растениях, зараженных бактериями *E. amylovora* и обработанных бактериофагами, симптомы поражения бактериальным ожогом не были отмечены. При этом, тестирование опытных растений в этом варианте показало наличие в тканях растений как патогенных бактерий *E. amylovora*, так и вирулентных к ним бактериофагов. На контрольных растениях симптомы поражения бактериальным ожогом плодовых отсутствовали.

Итак, было показано, что распространенность заболевания бактериальным ожогом плодовых на саженцах яблони, искусственно зараженных бактериями *E. amylovora* и обработанных бактериофагами, составила 25%, а биологическая эффективность бактериофагов *E. amylovora* в борьбе с бактериальным ожогом плодовых на саженцах яблони в условиях лаборатории составила 75% [30].

Биологическая эффективность бактериофагов *E. amylovora* в подавлении бактериального ожога на растениях айвы в теплице. В опыте по изучению биологической эффективности изолята бактериофагов 502фCr1-а в подавлении бактериального ожога на растениях айвы в теплице в качестве критерия была взята средняя длина побегов, так как проявление типичных симптомов поражения бактериальным ожогом было слабое. Среднюю длину побегов измеряли в середине вегетационного периода – июль, и в начале опадения листьев.

На рисунке 4.12. приведены результаты измерения средней длины побегов опытных растений в июле.

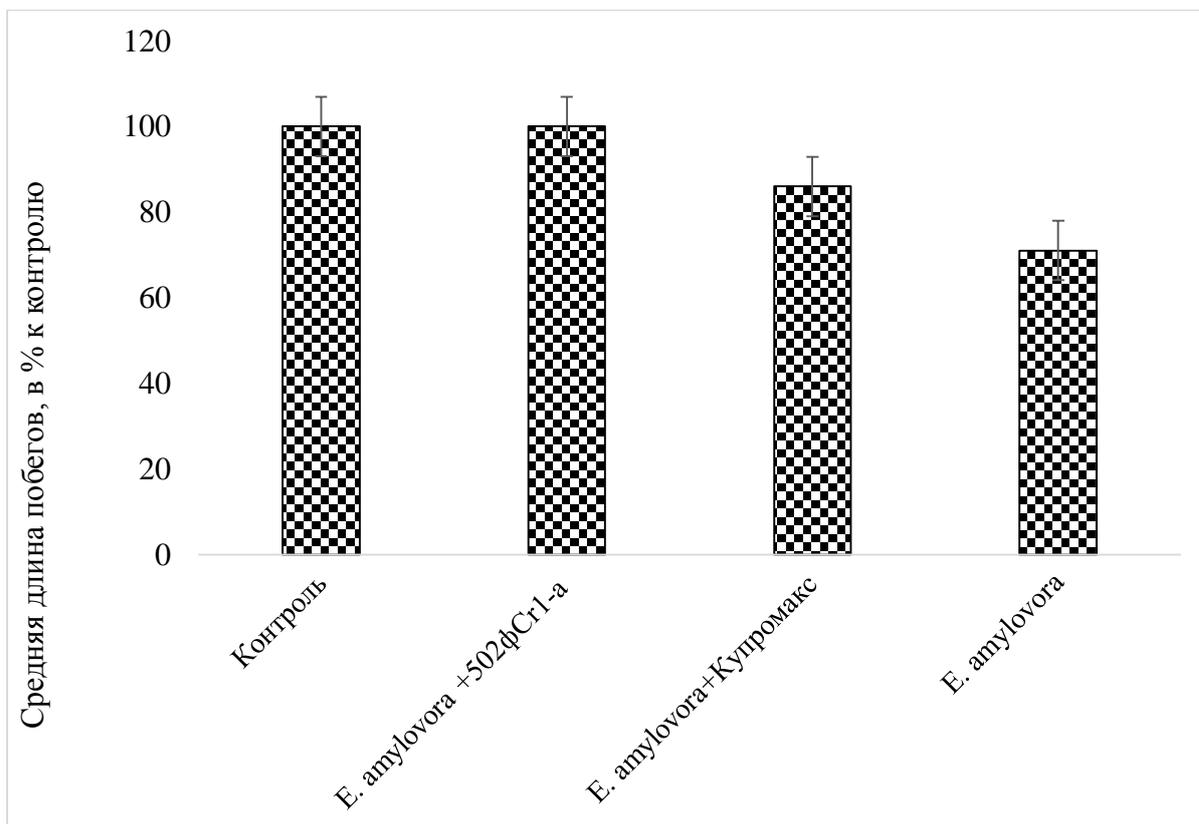


Рис. 4.12 . Средняя длина побегов растений айвы, в % к контролю, июль 2010 г.

По рисунку 4.12 видно, что в июле средняя длина побегов у растений, обработанных дистиллированной водой и бактериофагами была одинаковой и составила $21 \pm 0,75$ и $21 \pm 0,99$ см, соответственно. Средняя длина побегов у растений, зараженных бактериями *E. amylovora* была $15 \pm 0,73$ см, что составило 72% по отношению к контролю. В варианте, где растения обрабатывали медьсодержащим препаратом «Купромакс» средняя длина побегов была $18 \pm 1,34$ см, 86 % по отношению к контролю.

В этот период степень поражения бактериальным ожогом в опыте не достигала 2-ух баллов, а у растений, зараженных *E. amylovora* она была наибольшей и составила 1.5 балла.

В конце вегетационного сезона, перед началом опадения листьев, существенных различий в степени поражения опытных растений бактериальным ожогом между вариантами не выявлено. Однако в варианте, где растения были заражены *E. amylovora* одно растение погибло.

На рисунке 4.13 приведены результаты измерения средней длины побегов опытных растений в конце вегетационного сезона.

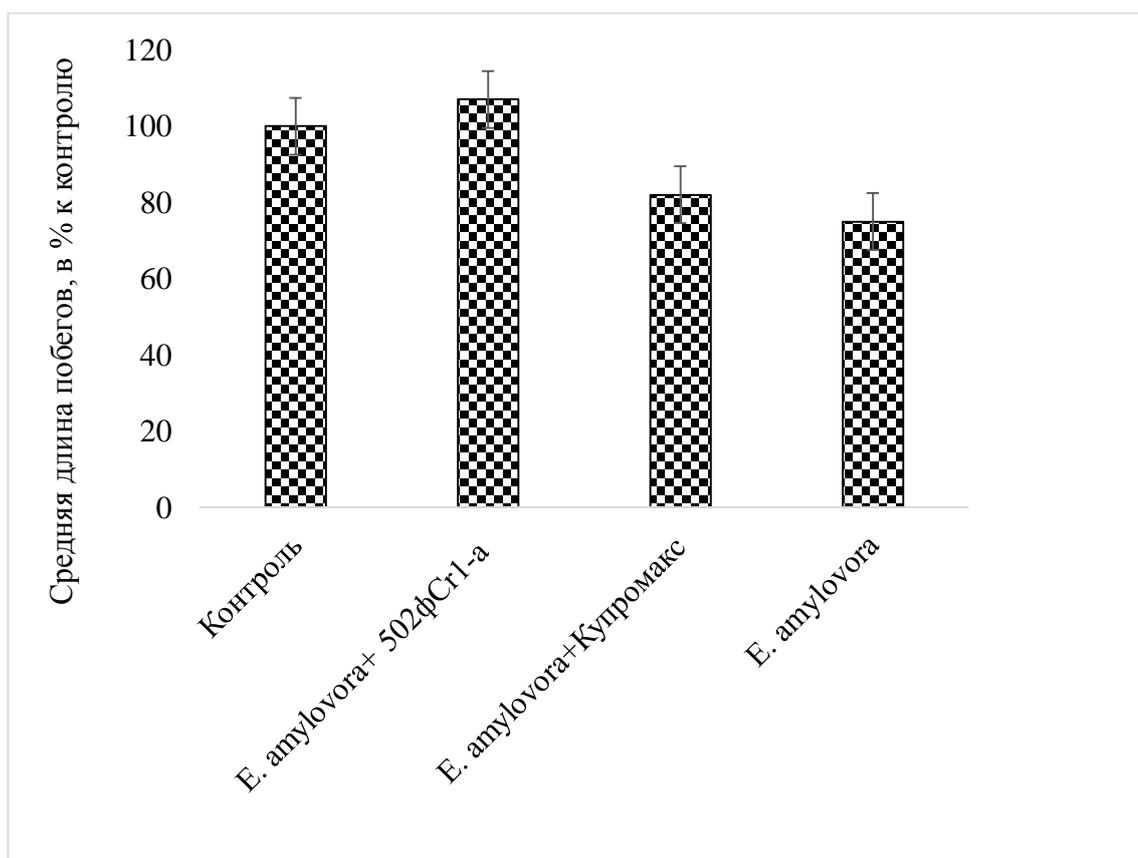


Рис. 4.13. Средняя длина побегов растений айвы в % к контролю, октябрь 2010 г.

На рисунке 4.13 видно, что в конце вегетационного сезона средняя длина побегов в контроле составляла $28 \pm 1,74$ см. В варианте, где растения были обработаны бактериофагами, средняя длина побегов была $30 \pm 1,45$ см, что на 7% больше, чем в контроле. Однако это различие не достоверно ($P > 0,05$). В то же время, были получены статистически достоверные различия ($P < 0,05$) в значениях средней длины побегов у растений, обработанных бактериофагами ($30 \pm 1,45$ см) и у растений, зараженных *E. amylovora* ($21 \pm 1,38$ см). Сравнительная оценка эффективности бактериофагов и химического препарата «Купромакс» в подавлении бактериального ожога на саженцах айвы показала, что бактериофаги по эффективности не уступали препарату «Купромакс». Так, средняя длина побегов растений, обработанных химическим препаратом ($23 \pm 1,52$ см.), статистически достоверно отличалась от этого значения ($30,0 \pm 1,45$ см), полученного после обработки бактериофагами [33].

Итак, изучение биологической эффективности изолята бактериофага 502φCr1-a в условиях, выделенного из тканей боярышника, предположительно принадлежащего к семейству *Microviridae*, показало, что он сдерживал развитие бактериального ожога на саженцах айвы в естественных температурных условиях при контролируемой влажности.

Биологическая эффективность бактериофагов в борьбе с бактериальным ожогом плодовых на подвоях айвы. Изоляты бактериофагов, показавшие высокую эффективность в подавлении роста патогенных бактерий *E. amylovora* в лаборатории, были испытаны в качестве агентов биологической борьбы с ожогом плодовых в полевых условиях. В течение пяти лет на подвоях айвы проведен опыт по изучению биологической эффективности бактериофагов в борьбе с бактериальным ожогом плодовых (рисунок 4.14). Из-за того, что в период проведения опытов сложились климатические условия, неблагоприятные для проявления симптомов бактериального ожога, в качестве критерия биологической эффективности бактериофагов использовали косвенный признак – средний годовой прирост побегов.



Рис. 4.14. Опытный участок ИГФЗР с подвоями айвы а) после высаживания растений (осень 2009 года); б) в начале вегетационного сезона 2015 года.

Опыт проводили в четырех вариантах:

- 1) обработка растений только водой (контроль);
- 2) заражение растений патогенными бактериями *E. amylovora*;
- 3) заражение растений патогенными бактериями *E. amylovora* с последующей обработкой фаголизатами;
- 4) заражение растений патогенными бактериями *E. amylovora* с последующей обработкой препаратом «Купромакс».

Заражение растений патогенными бактериями *E. amylovora* проводили однократно в начале вегетационного сезона в период распускания листьев инъекцией суспензии бактерий. Обработку бактериофагами проводили сразу после инфицирования бактериями *E. amylovora*, весной в период образования молодых побегов и в период вторичного роста

побегов, в третьей декаде августа. Обработку медьсодержащим препаратом «Купромакс» проводили в соответствии с рекомендациями по применению химических препаратов [2].

Учет симптомов поражения проводили в начале и в конце вегетационного сезона.

На рисунках 4.15 – 4.20 представлены результаты оценки биологической эффективности бактериофагов в подавлении бактериального ожога на саженцах айвы и погодные условия, вегетационного периода 2011 – 2013 гг.

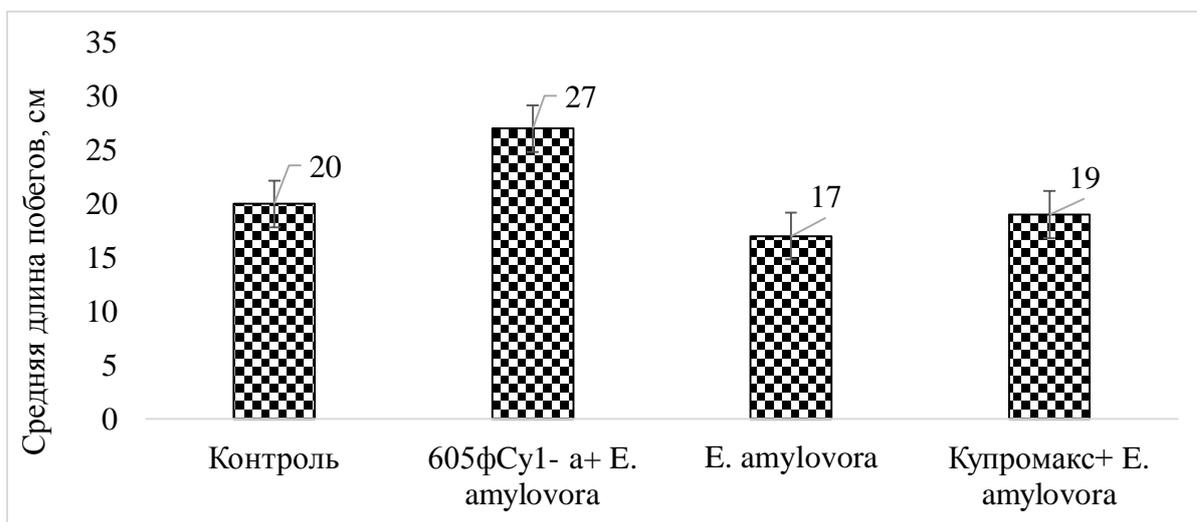


Рис. 4.15. Влияние обработок на средний прирост побегов при подавлении бактериального ожога на саженцах айвы.

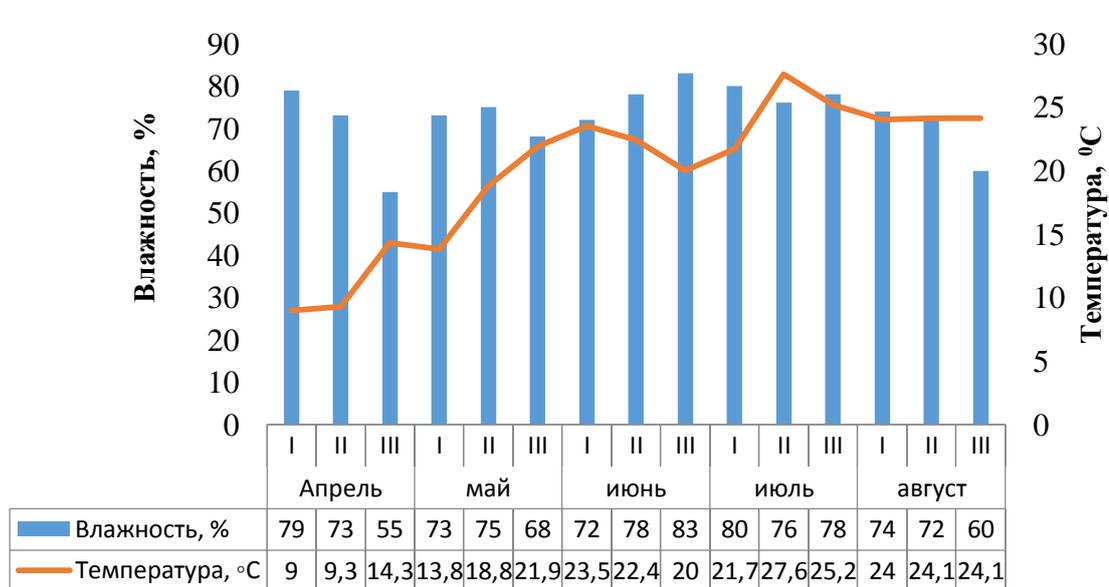


Рис. 4.16. Погодные условия, сложившиеся в вегетационный период 2011 г.

Наблюдения за растениями в 2011 г. показали, что на всех растениях на опытном участке цветение отсутствовало. Заражение патогеном и обработка бактериофагами

проводилась в конце апреля на фазе роста молодых побегов уколом в точку роста. В варианте с обработкой бактериофагами заражение патогеном сопровождалось опрыскиванием фаголизатом. В этот период сложились достаточно благоприятные погодные условия для проявления симптомов поражения патогеном: влажность воздуха составила 55% при средней температуре +14,3⁰С. Однако в мае средняя суточная температура стала повышаться и в конце месяца достигла 21,9⁰С. В течение лета 2011 г. температура воздуха была достаточно высокой. В целом, в 2011 г. температурные условия и средняя влажность воздуха в период проведения опыта были благоприятны для развития заболевания, однако видимых симптомов проявления болезни не наблюдалось.

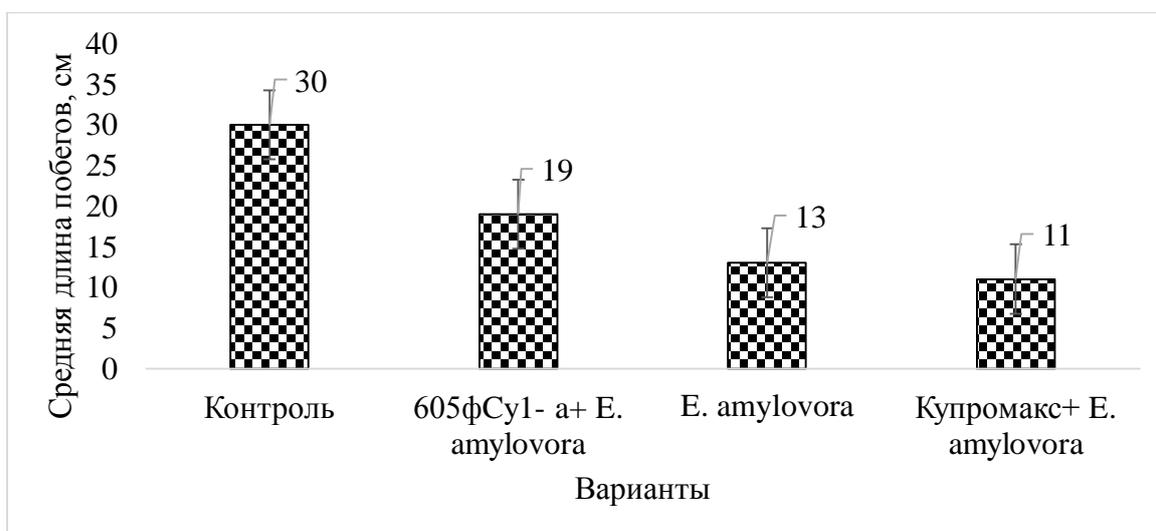


Рис. 4.17. Влияние обработок на средний прирост побегов при подавлении бактериального ожога на саженцах айвы в вегетационный период 2012 г.

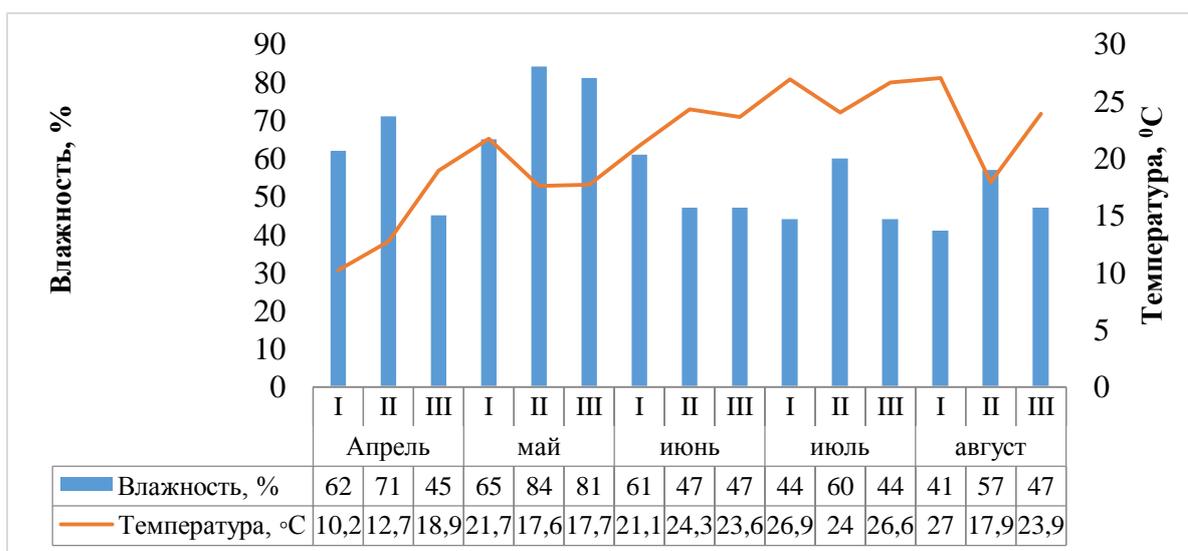


Рис. 4.18. Погодные условия вегетационного периода 2012 г.

В 2012 году растения на опытном участке также не цвели, а в период образования почек и роста молодых побегов температура и влажность были недостаточно благоприятны для развития бактериального ожога плодовых. Так, в третьей декаде апреля и первой декаде мая, во время роста молодых побегов влажность была 45% и 65% соответственно, что недостаточно для проявления ожога побегов. На опытных растениях видимые симптомы поражения бактериальным ожогом, как и в 2011 году, не проявились. Поэтому влияние патогена, бактериофагов и медьсодержащего препарата «Купромакс» вновь можно было оценивать только по косвенным признакам. В то же время на яблоне в период цветения в саду коммуны Бачой было отмечено поражение растений бактериальным ожогом с выделением молочно-белого экссудата на молодых побегах и цветоножках с образованием характерного крючка на молодых побегах.

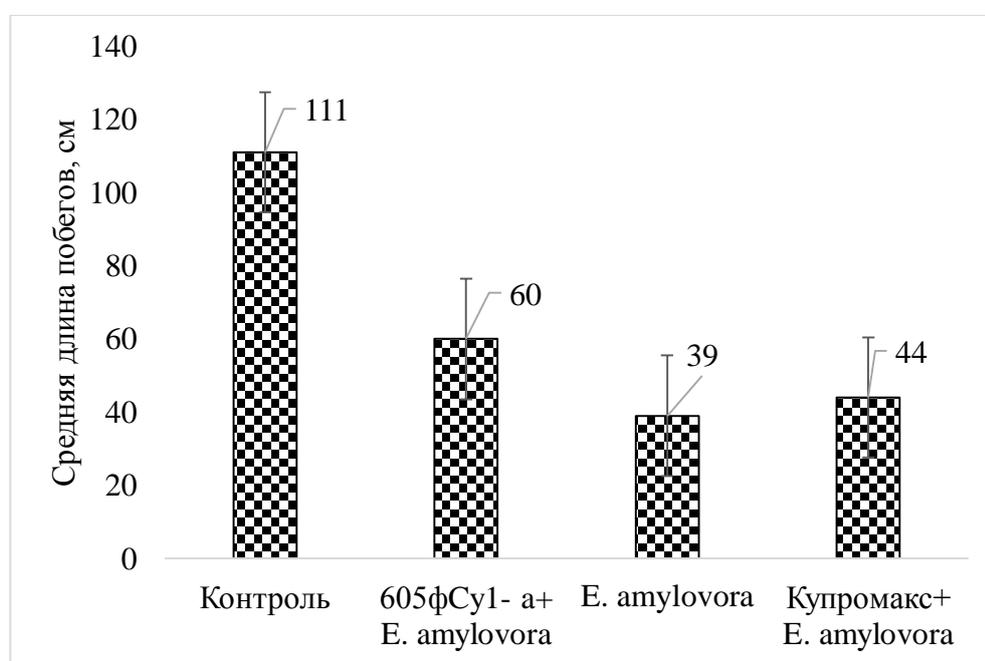


Рис. 4.19. Влияние обработок на средний прирост побегов при подавлении бактериального ожога на саженцах айвы в вегетационный период 2013 г.

В 2013 году растения были заражены патогенными бактериями *E. amylovora* на фазе распускания листьев в условиях, благоприятных для развития бактериального ожога. В этот период средняя температура воздуха была +15,9⁰С, а средняя влажность воздуха составила 63%. Однако, как и предыдущие годы, в течение вегетационного сезона симптомы поражения бактериальным ожогом на растениях айвы не проявлялись.

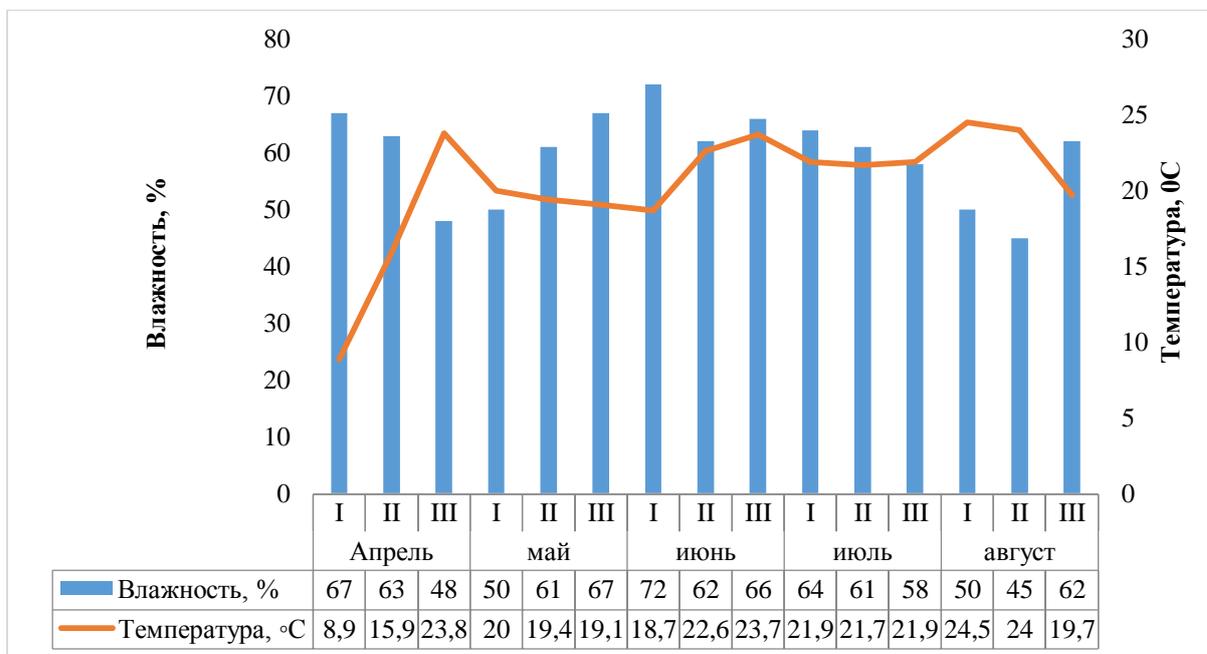


Рис. 4.20. Погодные условия вегетационного периода 2013 г.

Следует учитывать, что приведенные температурные данные отражают температуру воздуха в тени. При непосредственном воздействии солнечной радиации температура воздуха была значительно выше указанной на рисунках 4.16, 4.18 и 4.20 и могла превышать $+35^{\circ}\text{C}$. Такая температура не способствует проявлению вирулентности возбудителей бактериального ожога [94], хотя известно, что при высоких температурах происходит взаимодействие иммунной системы растений-хозяев и факторов вирулентности патогена [81].

Тем не менее, за три года проведения полевого опыта средний прирост побегов на подвоях айвы, зараженных патогенными бактериями *E. amylovora* и обработанных бактериофагами, был выше, чем у препарата «Купромакс». В 2011, в 2012 и в 2013 гг. средний прирост побегов у растений, обработанных бактериофагами, по сравнению с контролем был 135%, 63% и 54%, соответственно. В то время как средний прирост побегов у растений, зараженных патогенными бактериями *E. amylovora* и обработанных препаратом «Купромакс», в этот же период был 95%, 37% и 40% по сравнению с контролем, соответственно.

В 2014 году состояние растений на опытном участке оставалось без изменений. Однако, в 2015 году впервые за время проведения опытов на участке происходило цветение растений. По данным литературы известно, что фаза цветения растений-хозяев является особенно важной при взаимодействии патогенных бактерий *E. amylovora* и растений. На способность патогена развиваться в тканях хозяина, а значит и степень развития

заболевания, существенное влияние оказывает строение, возраст цветков, а также химический состав нектара. Установлено, что на яблоне сорта «Гала» бактерии *E. amylovora* могут расти на 12 дневных рыльцах пестиков, а опыление оказывает негативный эффект на способность рылец поддерживать рост бактерий [189]. С возрастом цветки становятся менее чувствительными к поражению тканей гипантия.

Проведенные нами наблюдения показали, что на опытном участке растения, обработанные дистиллированной водой обильно цвели. Растения, зараженные бактериями *E. amylovora* и обработанные фаголизатом цвели немного слабее. На растениях, зараженных бактериями *E. amylovora* наблюдались единичные цветки. Растения, зараженные бактериями *E. amylovora* и обработанные препаратом «Купромакс» не цвели. В конце вегетационного сезона плоды образовались только в вариантах, где растения были обработаны дистиллированной водой и фаголизатом (рисунок 4.21).



a-1



a-2



b-1



b-2



c-1



c-2



d-1



d-2

Рис. 4.21. Растения на опытном участке 6 мая 2015 года: а-1, а-2, – подвои айвы, обработанные дистиллированной водой; b-1, b-2, – подвои айвы, зараженные бактериями *E. amylovora* и обработанные фаголизатом; с-1, с-2,- подвои айвы, зараженные бактериями *E. amylovora*; d-1, d-2, - подвои айвы, зараженные бактериями *E. amylovora* и обработанные препаратом «Купромакс». 1 – май, 2015 г. 2 – сентябрь 2015 г.

Визуальная оценка общего состояния растений на опытном участке показала, что в течение всего вегетационного сезона лучше всего развивались растения в контроле (а). Развитие растений, зараженных бактериями *E. amylovora* и обработанных фаголизатом (b), было близким к контрольным растениям. Несколько хуже было развитие растений, зараженных бактериями *E. amylovora* и обработанных препаратом «Купромакс» (d). Наихудшим было состояние растений, зараженных бактериями *E. amylovora* (с).

Распространенность и интенсивность заболевания учитывали в мае в период цветения (рис. 4.22 а, б и в сентябре (рис. 4.22 с, d).

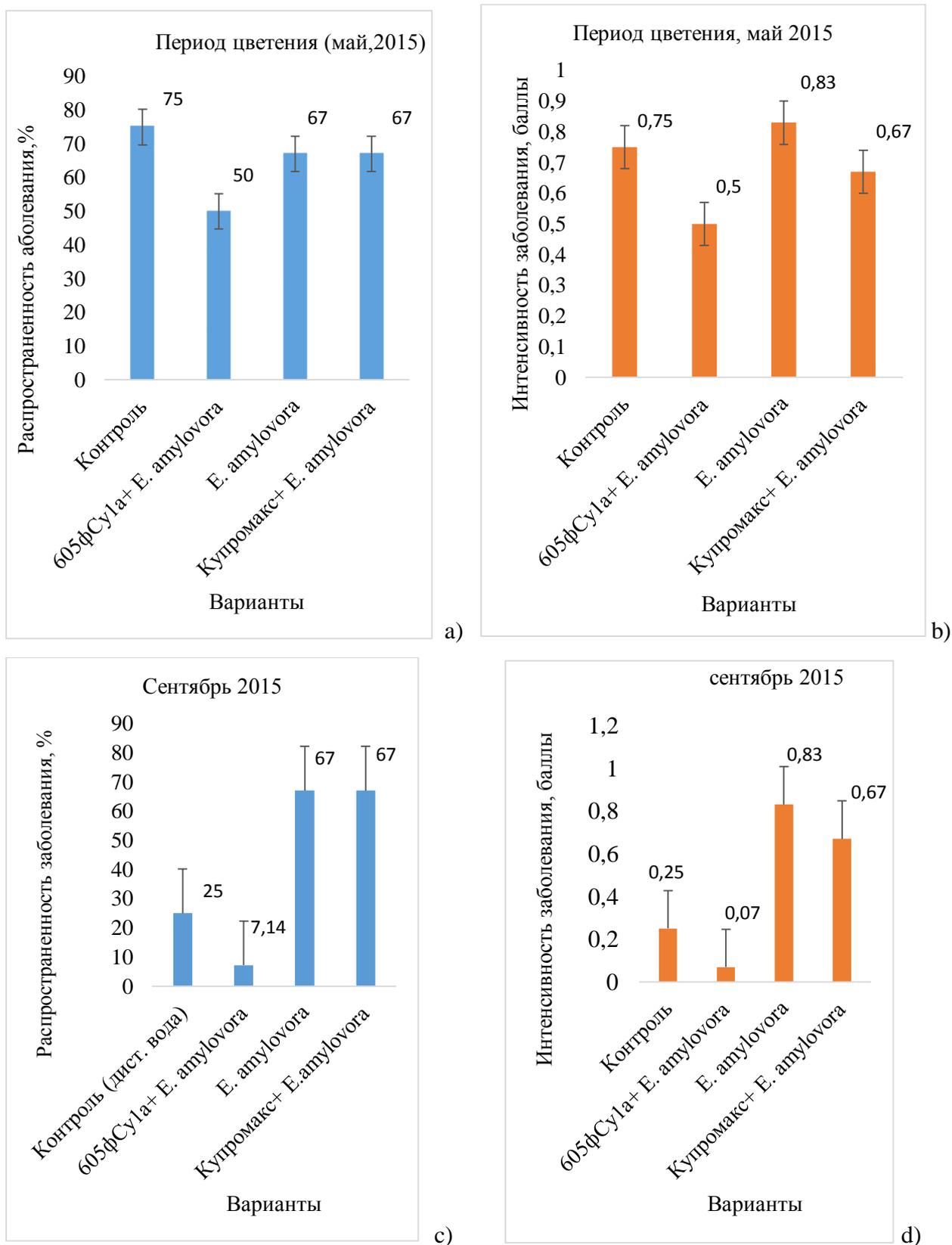


Рис. 4. 22. Распространенность и интенсивность заболевания на опытных растениях в мае 2015 г. в период цветения (а, б) и в сентябре (с, d)).

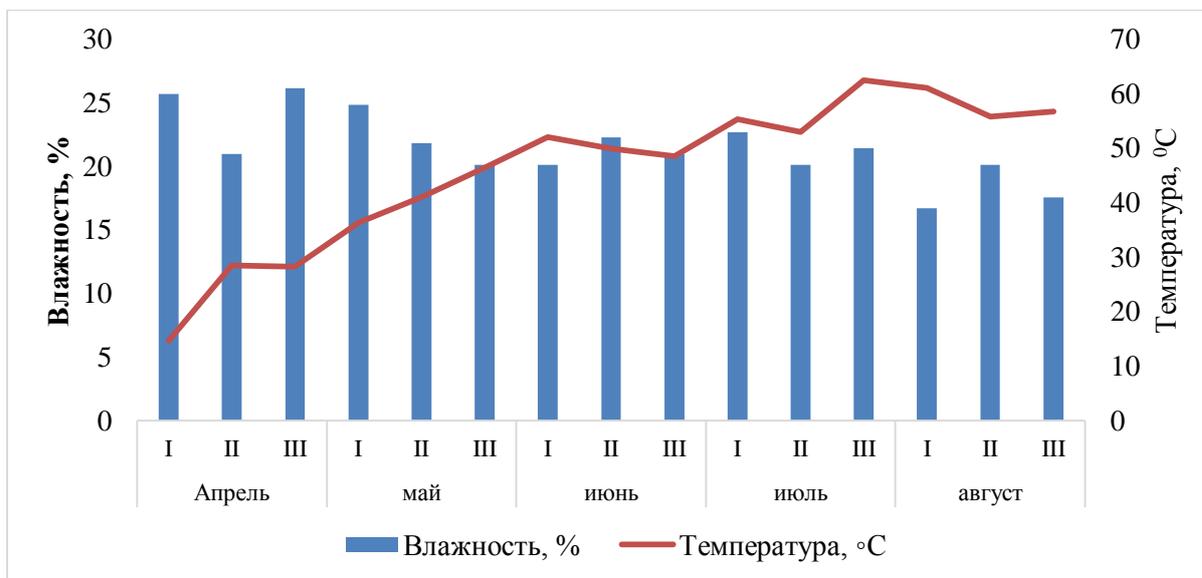


Рис. 4.23. Погодные условия вегетационного периода 2015 г.

Как показали наблюдения, в период цветения температура и влажность воздуха благоприятствовали развитию бактериального ожога. В первой декаде мая средняя температура воздуха была 15,6⁰C при средней влажности 58%. Поэтому в начале вегетационного периода симптомы на растениях во всех вариантах были хорошо видны, а интенсивность и распространенность заболевания были довольно высокими. Распространенность заболевания в варианте, где растения были заражены патогенными бактериями *E. amylovora* в начале вегетационного сезона была 67%, а интенсивность развития болезни составила 0.83 балла. Такие же показатели распространенности и интенсивности заболевания были в варианте, где растения были заражены бактериями *E. amylovora* и обработаны препаратом «Купромакс». В варианте, где растения были заражены бактериями *E. amylovora* и обработаны бактериофагами распространенность заболевания была 50%, а интенсивность развития болезни составила 0.5 балла. В контроле наблюдалось усыхание цветков, однако тестирование увядших цветков на наличие патогенных бактерий *E. amylovora* методом Уайта дало отрицательные результаты. Можно предположить, что патогенных бактерий, которые попали на растение естественным путем, было недостаточно для успешного развития в тканях растения. Возможно также, что увядание цветков было вызвано физиологическими факторами. Дальнейшие наблюдения за опытными растениями в период вегетации в условиях полевого опыта показали, что в неблагоприятных условиях для роста патогена (влажность воздуха ниже 50% и средняя температура воздуха до 26,8⁰C в летний период) симптомы заболевания на опытных растениях не развивались. Зоны

усыхания на пораженных побегах не увеличивались, а усохшие завязи опали без проявления симптомов на побегах.

То есть, в сентябре распространенность и интенсивность заболевания в варианте, где растения были заражены бактериями *E. amylovora* была 67% и 0,83 балла, соответственно. В варианте, где растения были заражены бактериями *E. amylovora* и обработаны бактериофагами, распространенность и интенсивность заболевания были 7,14% и 0,07 балла, соответственно. В варианте, где растения были заражены бактериями *E. amylovora* и обработаны препаратом «Купромакс» распространенность и интенсивность заболевания были такими же, как и в начале вегетационного сезона. В контроле, где растения обрабатывали дистиллированной водой, в конце вегетационного сезона распространенность заболевания, была 25%, а интенсивность заболевания 0,25 балла. В таблице 4.2 представлены результаты учета состояния опытных растений на 6-ой год после закладки опыта.

Таблица 4.2. Развитие растений на опытном участке в 2015 г. на шестой год после закладки опыта

Показатель	Варианты			
	Контроль (дистиллиро ванная вода)	Фаги + бактерии <i>E.</i> <i>amylovora</i>	Бактерии <i>E.</i> <i>amylovora</i>	Бактерии <i>E.</i> <i>amylovora</i> + «Купро макс»
Цветение (учет май 2015)	+	+	-	-
Образование плодов (учет 21.09.15)	+	+	-	-
Биологическая эффективность		89,0%		25,0%
Интенсивность заболевания, баллы	0,25	0,07	0,83	0,64
Распространенность заболевания, %	25%	7,14%	67%	67%

На шестой год проведения исследований влияния бактериофагов на развитие бактерий в тканях подвоев айвы, произрастающих на опытном участке, растения, зараженные патогенными бактериями *E. amylovora* и обработанные бактериофагами, были развиты лучше, чем растения, в варианте, где проводили заражение патогенными бактериями *E. amylovora* и в варианте, где растения, зараженные патогенными бактериями *E. amylovora*, обрабатывали препаратом «Купромакс». На растениях, обработанных фаголизатом, наблюдалось активное цветение, а к концу вегетационного сезона, как и на растениях в контроле (обработка дистиллированной водой) сформировались плоды.

Итак, обработка растений, инфицированных бактериальным ожогом, бактериофагами сразу после заражения бактериями *E. amylovora*, весной в период образования молодых побегов и в период вторичного роста побегов, в третьей декаде августа снижала распространенность заболевания на 59,86%. При этом биологическая эффективность бактериофагов, которую рассчитывали по формуле 2.2, в конце вегетационного сезона составила 89,0%.

По результатам проведенных экспериментов, обработка медьсодержащим препаратом Купромакс, который представляет собой 85% порошок хлорокси меди ($3\text{Cu}(\text{OH})_2\text{xCuCl}_2\text{xH}_2\text{O}$), оказывала недостаточно эффективное угнетающее воздействие на патогенной бактерии *E. amylovora*. При этом известно, что биологические свойства медьсодержащих препаратов определяются способностью ионов меди активно реагировать с ферментными и липопротеиновыми комплексами живых клеток и вызывать коагуляцию протоплазмы. Так, медьсодержащие препараты ингибируют процессы дыхания, а также вызывают неспецифическую денатурацию белков. Фитотоксичность препаратов меди зависит от концентрации ионов меди в растворе на поверхности растений, а также способности стеблей и листьев поглощать ее ионы. Установлена фитотоксичность медьсодержащих препаратов на цветках яблони сорта 'Gloster' в саду. При этом наименее токсичным был оксихлорид меди [145].

Сильнее всего фитотоксичность медьсодержащих препаратов проявляется в период активного роста растений [28]. Поэтому полученные результаты можно объяснить тем, что в опыте использовались молодые, активно растущие плодовые, чувствительные к ингибирующему воздействию ионов меди.

Медьсодержащие препараты также могут опосредовано влиять на бактериофаги, так как питание и энергетический статус клетки-хозяина оказывают существенное влияние на репликацию бактериофагов [236]. Поскольку ионы меди вызывают коагуляцию протоплазмы живых клеток, то можно предположить, что обработка медьсодержащими

препаратами оказывает негативное влияние на бактериофаги, лизирующие клетки бактерий.

В наших опытах по изучению влияния бактериофагов на популяции патогенных бактерий *E. amylovora* в тканях растений-хозяев в полевых условиях в большинстве случаев симптомы поражения бактериальным ожогом в результате искусственной инокуляции патогеном не проявлялись. Скорее всего, это объясняется тем, что проявление симптомов поражения бактериальным ожогом может быть только при оптимальном сочетании абиотических и биотических факторов. Установлено, что ключевым фактором при инфицировании растения-хозяина патогенным микроорганизмом являются колебания температуры. Изменение температуры окружающей среды приводит к выраженным изменениям двух различных иммунных ответов растений: иммунитета, активируемого молекулярными образцами патогена (*pattern-triggered immunity* - РТI) и эффектор активируемой устойчивости (*effector-triggered immunity* - ЕТI). ЕТI активируется растениями при относительно низких температурах (10~23⁰С), а РТI активируется при повышенных температурах (23~32⁰С). Поскольку именно низкие температуры способствуют тому, что патогенные бактерии выделяют большой набор эффекторов вирулентности, усиливающих патогенность, предполагается, что колебания температуры приводят к коэволюции различных иммунных реакции растений в ответ на физиологические изменения патогена [81]. Следовательно, отсутствие симптомов поражения не является свидетельством отсутствия патогена. Даже если явные симптомы заболевания не проявлялись, патоген присутствовал в тканях растения-хозяина, и, как показали результаты наших опытов, оказывал угнетающее влияние на развитие растения-хозяина. В то же время, патогенные бактерии *E. amylovora* служили резервуаром для бактериофагов.

Результаты полевого опыта, который мы проводили с 2009 по 2015 год на подвоях айвы, высаженных в открытом грунте, показывают, что бактериофаги способны удерживать размер популяции бактерий *E. amylovora* на уровне, не оказывающем угнетающего воздействия на рост растений. Имеющаяся информация позволяет сделать вывод о том, что каждое сообщество фагов и бактерий находится под влиянием абиотических факторов, характерных только для данной местности и определяющих характер и развитие взаимоотношений в такой системе. Поэтому эффект вызванной фагами селекции бактерий непредсказуем и зависит от естественного сообщества фагов и окружающих бактерий. Таким образом, применение фаготерапии должно разрабатываться с учетом особенностей отдельной системы «растение-хозяин – бактерия - бактериофаг». Только в этом случае можно будет успешно использовать главные особенности

бактериофагов: паразитирование только на бактериях и способность изменяться вместе с изменением бактериального хозяина в условиях изменяющейся окружающей среды.

4.3. Выводы к главе 4

1. Установлено, что при культивировании бактерий *E. amylovora* в ЛБ бульоне при температуре +28°C лаг-фаза продолжается 100 минут, фаза экспоненциального роста происходит 1 час 40 минут. В течение следующих 3 часов интенсивность роста количества бактерий понижается, после чего в течение 4 часов 40 минут происходит стационарная фаза роста бактерий. Через 10 часов 40 минут рост числа бактерий замедляется, и через 27 часов бактериальная культура находится в фазе отмирания.

2. Показано, что при использованном способе культивирования бактерий и бактериофагов, бактериофаги способны лизировать бактерии *E. amylovora* при добавлении 1 БОЕ/мл бактериофагов к 25 КОЕ/мл бактерий.

3. Установлено, что в естественных условиях концентрация бактериофагов изменяется в зависимости от условий окружающей среды, бактериального хозяина и фазы развития растения-хозяина,

4. В лабораторных опытах доказана биологическая эффективность фагов 605фСу1-а и 502фCr1-а.

5. В 1-й, 2-й и 3-й годы наблюдений средний прирост побегов у растений, зараженных патогенными бактериями *E. amylovora* и обработанных бактериофагами был 135, 63 и 54%, соответственно. В то время как у растений, зараженных патогенными бактериями *E. amylovora* и обработанных препаратом «Купромакс», этот показатель составлял 95, 37 и 40%, соответственно.

6. Биологическая эффективность бактериофагов на подвоях айвы в открытом грунте составила 89,0%.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Общие выводы

1. Выделены и охарактеризованы патогенные бактерии *Erwinia amylovora*, инфицирующие плодовые и декоративные растения семейства *Rosaceae*. Идентификация бактерий проведена на основании особенностей проявления симптомов на растениях-хозяевах, а также по комплексу культурально-морфологических свойств.

2. Установлено, что бактерии *Erwinia amylovora*, выделенные из разных растений-хозяев, существенно не различались по вирулентности и способности индуцировать реакцию гиперчувствительности. Степень вирулентности и степень индуцирования реакции гиперчувствительности составили от 0,4 до 0,8 баллов, и от 0,5 до 0,9 баллов, соответственно.

3. Описаны 13 изолятов бактериофагов *Erwinia amylovora*, выделенных из кроны растений, пораженных бактериальным ожогом и их почвы. Наибольшая концентрация бактериофагов обнаружена в образцах, взятых из кроны айвы 7×10^4 БОЕ/г. Меньше всего бактериофагов было в тканях яблони - 10^2 БОЕ/г.

4. По данным электронного микроскопирования и методом ПЦР с использованием *tls* маркеров в четырех изолятах фагов, выделенных из почвы, и пяти изолятах фагов, выделенных из кроны растений, идентифицированы вирусы группы М7 (*Myoviridae* и *Siphoviridae*). Во всех исследованных образцах не выявлено бактериофагов представителей группы L1 (*Podoviridae*).

5. Установлено, что при культивировании в жидкой культуре (ЛБ бульон) при температуре + 28⁰С, наибольшая концентрация бактериофагов достигается при инокуляции бактерий *E. amylovora* на фазе экспоненциального роста, длительностью 1 час 40 минут. Фаги способны лизировать бактерии при соотношении 1 фаговая частица :25 бактериальных клеток.

6. Показано, что в период с высокими температурами и низкой влажностью концентрация фагов *Erwinia amylovora* в тканях растений минимальна. При благоприятных условиях для развития бактерии-хозяина концентрация бактериофагов достигает 10^4 БОЕ/мл.

7. Биологическая эффективность бактериофагов 605фСу1-а в естественных условиях на подвоях айвы составила 89,0%.

Практические рекомендации

1. Бактериофаги 605фСу1-а можно использовать в качестве средства борьбы с бактериальным ожогом плодовых, поскольку они способны удерживать размер популяции бактерий *E. amylovora* на уровне, не оказывающем угнетающего воздействия на рост растений.

2. Для защиты саженцев плодовых от поражения бактериальным ожогом рекомендуется использовать бактериофаги 605фСу1-а, в концентрации 10^8 БОЕ/мл- 10^9 БОЕ/мл.

3. При приготовлении фаголизата, фаги следует вносить в бактериальную культуру через 3 часа с начала культивирования бактерий на питательной среде Лурия Бертрани при температуре $+28^{\circ}\text{C}$.

4. Для защиты саженцев плодовых от бактериального ожога рекомендуется проводить обработки бактериофагами во время цветения в мае и в период вторичного роста побегов, в третьей декаде августа.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Mager M. ș.a. Combaterea bacteriozelor la culturile semintoase (recomandari). Chishinau. 2000. 32 p.
2. Registrul de stat al produselor de uz fitisanitar și al fertilizantilor, permise pentru utilizare în Republica Moldova, Chișinău, 2012. 312 p.
3. Serviciul Hidrometeorologic de Stat <http://www.meteo.md/> (просмотрен 29.04.15)
4. Severin V. Focul bacterian al Rozaceelor [*Erwinia amylovora*]. București: Ceres, 1996. 59 p.
5. Spoială L. ș.a. Resursele naturale și mediul în Republica Moldova. Culegere statistică Chișinău 2011. 105 p.
6. Zemcic E., Luchita V. Diagnosticul serologic al bacteriei *Erwinia amylovora*, patogenului focului bacterian al pomilor fructiferi prin tehnica DAS ELISA. În: Protecția plantelor, anul VII n 27 Societatea Națională de protecție a plantelor. Romania, 1997, p. 162-164.
7. Адамс М. Бактериофаги. Москва: Изд. иностранной литературы, 1961. 527 с.
8. Бакшан О.Я., Садляк А.М. Диагностика бактериального ожога плодовых. В: Защита растений, 2004, nr. 3, с. 46-47.
9. Билай В.И. и др. Микроорганизмы – возбудители болезней растений. Киев: Наукова думка, 1988. 552 с.
10. Буркальцева М.В. и др. Бактериофаг phi29 – новый вид умеренных фагов *Pseudomonas aeruginosa* с мозаичным геномом: возможное использование в фаготерапии В: Генетика, 2011, т. 47, nr. 7, с. 900-904.
11. Вердеревский Д.Д. Бактериальный ожог плодовых деревьев. В: Садоводство, виноградарство и виноделие Молдавии, 1960, nr. 3. с. 60-61.
12. Волошин С. А., Капрельянц А. С. Межклеточные взаимодействия в бактериальных популяциях. Обзор. В: Биохимия, 2004, т. 69, nr. 11, с.1555-1564.
13. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
14. Д’Эррель Ф. Бактериофаг и его значение для иммунитета. М.-Л.:Госиздат, 1926. 233 с.
15. Зайцева Ю.В., Попова А.А., Хмель И.А. Регуляция типа Quorum sensing у бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. В: Генетика, 2014, том 50, nr. 4, с. 373-391.
16. Израильский В.П. Бактериальные болезни растений. Москва: Колос, 1979. 231 с.
17. Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Системы коммуникаций у бактерий и их роль в патогенности. В: Молекулярная генетика микробиология и вирусология, 2006, nr. 3, с. 22-29.
18. Искандерян Р.А., Арутюнян А.Г. Бактериальный ожог плодовых в Армении. В: Защита растений, 1991, nr. 4, с.50.
19. Камилова Е.В. и др. Биологическая защита растений композитами бактериофагов как основа

- экологического земледелия. В: Мат. междунар. научно-практической конф. «Биологическая защита растений как основа экологического земледелия и фитосанитарной стабилизации агроэкосистем». Краснодар, 2010, с. 789-793.
20. Кирай З., Клемент З., Вереш И. Методы фитопатологии. М.: Колос, 1974. 343 с.
 21. Крылов В.Н. Фаготерапия с точки зрения генетики бактериофага: надежды, перспективы, проблемы безопасности, ограничения. В: Генетика, 2001, т. 37, nr. 7, с. 869-887.
 22. Лукица В., Земчик Е., Мындра В. Иммунобиотехнологические методы диагностики возбудителя ожога плодовых культур (*E. amylovora*). В: Inginerie genetică și biotehnologii moderne. AȘ a RM Institutul de Genetică Chișinău, 1998, p. 219-222.
 23. Месянжинов В.В. и др. Молекулярная архитектура бактериофага T4. В: Биохимия, 2004, т. 69, nr. 11, с. 1463-1476.
 24. Мирошников К.А. и др. Пептидогликанизирующие ферменты бактериофагов – перспективные противобактериальные агенты. В: Успехи биологической химии, 2006, т. 46, с. 65-98.
 25. Никитина К.В., Калиниченко Р.И., Машара Н.А. Методические указания по исследованию и определению возбудителей бактериозов плодовых культур и оценке сравнительной устойчивости сортов к этим патогенам. Владивосток, 1974. 86 с.
 26. 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.
 27. Погода и Климат <http://www.pogodaiklimat.ru/> (просмотрен 29.04.15)
 28. Попов С.Я. Дорожкина Л.А., Калинин В.А. Основы химической защиты растений. Москва: Арт-Лион, 2003. 208 с.
 29. Самойлова А. Бактериофаги: проблемы и перспективы использования в борьбе с бактериальными заболеваниями. В: Mediul Ambient, nr.1 2014, p. 27-31.
 30. Самойлова А.В. Влияние бактериофагов *Erwinia amylovora* на развитие саженцев яблони, зараженных бактериальным ожогом. В: Матер. докл. Междунар. симпозиума «Защита растений – достижения и перспективы». Кишинев, 2009, с.364-365.
 31. Самойлова А. Оценка вероятности возникновения эпифитотии бактериального ожога в лесах центральной части Молдовы. В: Materialele Simpozionului științific internațional Rezervația «Codrîi», 2011, p. 334-336.
 32. 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.
 33. Самойлова А.В., Волощук Л.Ф. Возможность использования бактериофагов *Erwinia*

- amylovora* в сдерживании развития бактериального ожога плодовых. В: Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 40-летию со дня организации РУП «Институт защиты растений», Несвиж, 2011. С. 343-346
34. Самойлова А.В., Мындра В.Г., Тертяк Д.Д. Выделение бактериофагов *Erwinia amylovora* из надземных частей растений семейства *Rosaceae*. В: Международная научно-практическая конференция «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем», Краснодар, 2004, с. 102.
 35. Самойлова А.В., Тертяк Д.Д. Бактериофаги *Erwinia amylovora*, выделенные из *Cerasus Tomentosa* (Thunb.) Wall В: 7-я Международная научно-практическая конференция «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем», Краснодар 2012, с. 207-210.
 36. Самойлова А. В., Тертяк Д. Д. Бактериофаги *Erwinia amylovora*, перспективные для сдерживания развития бактериального ожога плодовых. В: Международный научный симпозиум «Защита растений: проблемы и перспективы», Кишинэу, 2012, с. 242-245.
 37. Словарь микробиологии http://dic.academic.ru/dic.nsf/dic_microbiology (посет. 10.01.12)
 38. Стент Г. Молекулярная генетика. Москва: Мир, 1974. 535 с.
 39. Семчук Л.І., та ін. Вживання фагів в природі та терміни збереження їх біологічної активності. В: Фитопатогенные бактерии. Фитонцидология. Аллелопатия. Сборник статей участников междунар. научной конференции 2005, Киев, с. 130-133.
 40. Abedon S.T., Hуman P., Thomas C. Experimental examination of bacteriophage latent-period evolution as a response to bacterial availability. In: Applied and Environmental Microbiology, 2003, vol. 69, nr. 12, p. 7499-7506.
 41. Ackermann H. W., Prangishvili D. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. In: Archives of Virology, 2012, vol. 157, nr. 10, p.1843-1849.
 42. Adriaenssens E.M. et al. T4-Related Bacteriophage LIMEstone isolates for the control of soft rot on potato caused by *Dickeya solani*. Johnson EA, ed. PLoS ONE, 2012, vol.7, nr. 3:e33227. doi:10.1371/journal.pone.0033227.
 43. Aldridge P., Metzger M., Geider K. Genetics of sorbitol metabolism in *Erwinia amylovora* and its influence on bacterial virulence. In: Molecular and General Genetics. 1997, vol.256, nr. 6, p. 611-619.
 44. Alfano, J.R., Collmer, A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. In: Ann. Rev. of Phytopath., 2004, nr. 42, p.385-414.
 45. Alhudaib K., Rezk A. Is fire blight present in Saudi Arabia? In: 13th ISHS International Fire Blight Workshop abstract book, 2013, p.69.

46. Ashelford K. E. et al. Seasonal population dynamics and interactions of competing bacteriophages and their host in the rhizosphere. In: Applied and environmental microbiology, 2000, vol. 66, nr. 10, p. 4193–4199.
47. Asselin J. E. et al. Eop1 from a Rubus strain of *Erwinia amylovora* functions as a host-range limiting factor. In: Phytopathology, 2011, vol. 101, nr. 8, p. 935-944.
48. Badosa E. et al. Prospects and limitations of synthetic antimicrobial peptides for fire blight control. In: 13th ISHS International Fire Blight Workshop abstract book, 2013, p. 31.
49. Baicui T, et al. First occurrence of fire blight in Romania. In: EPPO Bulletin, 1994, vol. 24, nr. 1, p. 129–134.
50. Baldwin C.H.Jr., Goodman R.N. Prevalence of *Erwinia amylovora* in apple buds as detected by phage typing. In: Phytopathology, 1963, nr. 53, p.1299-1303.
51. Baranauskaite L. et al. The monitoring of *Erwinia amylovora* in Lithuania (1998-2012). In: 13th ISHS International Fire Blight Workshop abstract book, 2013, p. 69.
52. Barionovi D.et al. Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different host plants using repetitive-sequences PCR analysis, and restriction fragment length polymorphism and short-sequence DNA repeats of plasmid pEA29. In: J. of Applied Microbiology, 2006, vol.100, p.1084-1094.
53. Barnard A.M.L. Salmond G.P.S. Quorum sensing in *Erwinia* species. In: Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, vol.387, nr. 2, p. 415-423.
54. Barny M.A. et al. Cloning of a large gene cluster involved in *Erwinia amylovora* CFBP1430 virulence. In: Molecular Microbiology, 1990, vol. 4, nr. 5, p.777-786.
55. Bayot R, Ries S. Role of motility in apple blossom infection by *Erwinia amylovora* and studies of fire blight control with attractant and repellent compounds. In: Phytopathology, 1986, vol. 76, p.441–445.
56. Bellemann P.et al. Visualization of capsule formation by *Erwinia amylovora* and assays to determine amylovoran synthesis. In: Int. J. of Biological Macromolecules. 1994, vol. 16, p.290-296.
57. Bellemann P., Geider K. Localization of transposon insertions in pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora* and their biochemical characterization. In: Journal of General Microbiology, 1992, vol.138, p.931–940.
58. Bereswill S., Geider K. Characterization of the *rcaB* gene from *Erwinia amylovora* and its influence on exopolysaccharide synthesis and virulence of the fire blight pathogen. In: Journal of Bacteriology. 1997, vol.179, p.1354-1361.
59. 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.

60. Billing E. An association between capsulation and phage sensitivity in *Erwinia amylovora*. In: Nature, 1960, vol.186, p.819-820.
61. Billing E. The value of phage sensitivity tests for the identification of phytopathogenic *Pseudomonas* spp. In: Journal of Applied Bacteriology, 1963, nr. 26, p. 193-210.
62. Billing E., Crosse J.E., Garrett C.M.E. Laboratory diagnosis of fire blight and bacterial blossom blight of pear. In: Plant Pathology, 1960, vol.9, p. 19-25.
63. Blakely G.W. Smarter than the average phage. In: Molecular Microbiology, 2004, vol.54, nr. 4, p.851-854.
64. Bobev, S.G. et al. Fire blight spread in Bulgaria and characteristics of the pathogen *Erwinia amylovora*. In: Acta Horticulturae (ISHS), 2011, vol. 896, p.133-140.
65. Bocsanczy A.M. et al. HrpN of *Erwinia amylovora* functions in the translocation of DspA/E into plant cells. In: Molecular Plant Pathology, 2008, vol. 9, p. 425–434.
66. Bogdanove A.J., et al. Homology and functional similarity of an hrp-linked pathogenicity locus, dspEF, of *Erwinia amylovora* and the avirulence locus avrE of *Pseudomonas syringae* pathovar tomato. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1998, vol.95, nr. 3, p.1325-1330.
67. Bogs J., Geider K. Molecular analysis of sucrose metabolism of *Erwinia amylovora* and influence on bacterial virulence. In: J. of Bacteriology, 2000, vol.182, nr 19, p.5351-5358.
68. Born Y. et al. The tail-associated depolymerase of *Erwinia amylovora* phage L1 mediates host cell adsorption and enzymatic capsule removal, which can enhance infection by other phage. In: Environmental Microbiology, 2014, vol.16, nr. 7, p. 2168-2180.
69. 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.
70. 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.
71. Brauna P.G., Hildebrand P.D. Infection, carbohydrate utilization, and protein profiles of apple, pear, and raspberry isolates of *Erwinia amylovora*. In: Canadian Journal of Plant Pathology, 2005, vol. 27, nr. 3, p. 338-346.
72. Bremer B. et al, An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP*11 In: Botanical Journal of the Linnean Society, 2009, nr.161, p.105–121.
73. Breth D.I. et al. The presence of *Erwinia amylovora* in asymptomatic apple bud wood: a threat to newly established apple plantings. In: Acta Hort.(ISHS), 2014, vol. 1056, p.235-238.

74. Brogini G.A.L. et al. Detection of the fire blight biocontrol agent *Bacillus subtilis* BD170 (Biopro) in a Swiss apple orchard. In: European Journal of Plant Pathology, 2005, vol. 111, p. 93-100.
75. Brussow H., Hendrix R.W. Phage genomics: Small is beautiful. In: Cell, 2002, vol. 108, p. 13–16.
76. Bühlmann A. et al. *Erwinia amylovora* loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid pathogen detection and on-site fire blight diagnosis. In: 13th ISHS International Fire Blight Workshop abstract book, 2013, p.62.
77. Burse A., Weingart H., Ullrich M.S. The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. In: Molecular Plant Microbe Interactions, 2004, vol.17, nr. 1, p.43-54.
78. Cabrefiga J., Montesinos E. Analysis of aggressiveness of *Erwinia amylovora* using disease-dose and time relationships. In: Phytopathology, 2005, vol.95, p.1430–1437.
79. Casjens S. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? In: Molecular Microbiology, 2003, vol.49, nr. 2, p. 277-300.
80. Cesbron S. et al. The alternative sigma factor HrpL negatively modulates the flagellar system in the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora* under hrp-inducing conditions. In: FEMS Microbiological Letters, 2006, vol. 257, nr. 2, p.221-227.
81. Cheng C. et al. Differential temperature operation of plant immune responses. Nature communications. 2013, vol. 4, 2530. doi:10.1038/ncomms3530.
82. Civerolo E.L., Kiel H.L. Inhibition of bacterial spot of peach foliage by *Xanthomonas pruni* bacteriophage. In: Phytopathology, 1969, vol. 59, p. 1966–1967.
83. 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.
84. Delitheos A. et al. Antiphage activity in extracts of plants growing in Greece. In: Phytomedicine, 1997, vol. 4, nr .2, p. 117–124.
85. Dellagi A. et al. Dual Role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. In: Molecular Plant-Microbe Interactions, 1998, vol.11, nr. 8, 734-742.
86. De Zoysa, G et al. A mechanistic investigation into the inhibition of growth and biofilm formation in *Erwinia amylovora* by non-protein amino acids. In: Acta Hort. (ISHS), 2011, vol.896, p.541-545.
87. Djaimurzina A.A., Zharmukhamedova G.A. Etiology of causative agent fire blight – *Erwinia amylovora* (Burrill) Winston et al. – in the southeast of Kazakhstan. In: 13th ISHS International Fire Blight Workshop abstract book, 2013, p.70.

88. Dong Y.-H., Wang L.-H., Zhang L.-H. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. In: Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2007, vol. 362, nr.1483, p. 1201–1211.
89. Drulis-Kawa Z. et al. Learning from bacteriophages – advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. In: Current Protein & Peptide Science, 2012, vol.13, nr. 8, p.699-722.
90. Duffy, B. et al. Environmental monitoring of antibiotic resistance and impact of streptomycin use on orchard bacterial communities. In: Acta Hort. (ISHS), 2011, vol. 896, p.483-488.
91. Edmunds A.C. et al. Cyclic Di-GMP modulates the disease progression of *Erwinia amylovora*. In: Journal of Bacteriology, 2013, vol. 195, nr. 10, p.2155-2165.
92. Erskine J. M. Characteristics of *Erwinia amylovora* bacteriophage and its possible role in the epidemiology of fire blight. In: Canadian Journal of Microbiology, 1973, vol. 19, p.837-845.
93. Erskine J.M., Lopatecki L.E. *In vitro* and *in vivo* interactions between *Erwinia amylovora* and related saprophytic bacteria. In: Can. J. Microbiol., 1975, vol. 21, nr. 1, p. 35-41.
94. Farkas A., Mihalik E., Dorgai L. Floral traits affecting fire blight infection and management. In: Trees. 2012, nr. 26 p. 47-66.
95. Feiss M., Rao V.B. The bacteriophage DNA packaging machine. In: Advances in Experimental Medicine and Biology, 2012, nr. 726, p. 489-509.
96. Fenton M. et al. Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. In: Bioengineered Bugs, 2010, vol.1, nr. 1, p.9-16.
97. Fischetti V.A. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. In: Current Opinion in Microbiology, 2008, vol. 11, nr. 5, p. 393-400.
98. Flaherty J.E. et al. Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with H- mutant bacteriophages. In: Hort Science, 2000, vol.35, nr. 5, p. 882–884.
99. Frampton R.A., Pitman A.R., Fineran P.C. Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens. In: International Journal of Microbiology, 2012, vol. 2012 <http://www.hindawi.com/journals/ijmb/2012/326452/> (visited 10.12.2012)
100. Fried A. et al. Control of fire blight in Baden-Württemberg at the end of the streptomycin era. In: 13th ISHS Int. Fire Blight Workshop abstract book, 2013, p.22.
101. Friman V-P., et al. High temperature and bacteriophages can indirectly select for bacterial pathogenicity in environmental reservoirs. Brockhurst M, ed. PLoS ONE. 2011;6(3):e17651. doi:10.1371/journal.pone.0017651.
102. Fujiwara A. et al. Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. In: Appl. and Environmental Microbiology, 2011, vol. 77, nr. 12, p.4155–4162.

103. Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. In: J. Bacteriol, 1994, vol.176, nr.2, p. 269-275.
104. Gandra S., Gilbert P. The development of a small-scale biofilm model suitable for studying the effects of antibiotics on biofilms of Gram-negative bacteria. In: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1997, vol.40, p. 329–334.
105. Gao Y. et al. The luxS gene is involved in AI-2 production, pathogenicity, and some phenotypes in *Erwinia amylovora*. In: Current Microbiology, 2009, vol.58, nr 1, p.1-10.
106. Gavrilovic V. Sadašnjje mogućnosti suzbijaja bakterije *E. amylovora*. In: Jugosloven vočar, 1998, vol.32, nr. 1-2, p. 127-132.
107. Gavrilović V. et al. Characterization of *Erwinia amylovora* strains isolated from quince trees in Serbia using REP-PCR method. In: 13th ISHS International Fire Blight Workshop abstract book, 2013, p.73.
108. Gill J .J. et al. Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. In: Applied and Environmental Microbiology, 2003, vol. 69, p. 2133-2138.
109. Goodman R. N., Shaffer W. H. Jr. Heterogeneity of bacterial isolates from apple buds that are sensitive to *Erwinia amylovora* phages. In: Phytopathology, 1963, vol. 60, p. 1293.
110. Goodridge L.D., Bisha B. Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. In: Bacteriophage, 2011, vol. 1, nr. 3, p. 130-137.
111. Goto M. Fundamentals of bacterial plant physiology. NY: Academic Press, 1992. 342 p.
112. Gross M. et al. Levan and levansucrase synthesized by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. In: Physiological and Molecular Plant Pathology, 1992, vol.40, p.371–338.
113. Gusberti M. et al. GM crops, antibiotics and pesticides: good or evil and for whom? A case study with apple and fire blight. In: 13th ISHS Int. Fire Blight Workshop abstract book, 2013, p.70.
114. Hagens S., Loessner M.J. Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. In: Current Pharmaceutical Biotechnology, 2010, vol. 11, nr.1, p.58-68.
115. Hall J.P., Harrison, E., Brockhurst, M.A. Viral host-adaptation: insights from evolution experiments with phages. In: Current Opinion in Virology, 2013, nr. 3, p. 572-577.
116. Harrison A., Gibbins L.N. The isolation and characterization of a temperate phage Y46/(E2) from *Erwinia herbicola* Y46. In: Can. Journal of Microbiology, 1975, vol. 21, p. 937-944.
117. Hartung J.S., Fulbright D.W., Klos E.J., Cloning of a bacteriophage polysaccharide depolymerase gene and its expression in *Erwinia amylovora*. In: Molecular Plant-Microbe Interactions, 1988, vol. 1, nr. 2, p. 87-93.
118. Hevesi M. et al. Investigating the virulence of *Erwinia amylovora* isolates by using apple tissue culture and pear fruit. In: Acta Horticulturae (ISHS), 2011, vol.896, p.223-230.

119. Huber K.E., Waldor M.K. Filamentous phage integration requires the host recombinases XerC and XerD. In: Nature, 2002, nr. 6, p. 417.
120. Ignoffo C.M., Garcia C. Antioxidant and oxidative enzyme effects on the inactivation of inclusion bodies of the heliothis baculovirus by simulated sunlight-UV. In: Environmental Entomology, 1994, nr. 23, p, 1025–1029.
121. Ignoffo C.M., Garcia C. Aromatic/heterocyclic amino acids and the stimulated sunlight-UV inactivation of the Heliothis/Helicoverpa baculovirus. In: Env. Entomology, 1995, nr. 24, p. 480–482.
122. International Committee on Taxonomy of Viruses <http://ictvonline.org/virustaxonomy.asp> (просмотрен 20.01.13)
123. Iriarte F.B. et al. Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. In: Applied and environmental microbiology, 2007, vol. 73, nr. 6, p. 1704–1711.
124. Johnson K.B., Stockwell V.O. Management of fire blight: a case study in microbial ecology. In: Annual Review Phytopathology, 1999, vol.36, p.227-248.
125. Johnson K. B., Temple, T. N. Evaluation of strategies for fire blight control in organic pome fruit without antibiotics. In: Plant Disease, 2013, vol.97, p.402-409.
126. Johnson K. B. et al. Strategy for non-antibiotic fire blight control in U.S.-grown organic pome fruit. In: 13th ISHS Int. Fire Blight Workshop, abstract book, 2013, p.27.
127. Jones J. B. et al. Bacteriophages for plant disease control. In: Annual Review of Phytopathology, 2007, nr. 45, p. 245-262.
128. Jurgens A.G., Babadoost M. Sensitivity of *Erwinia amylovora* in Illinois apple orchards to antibiotics and copper. In: 13th ISHS Int. Fire Blight Workshop abstract book, 2013, p.33.
129. 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.
130. Kharchenko A. et al. Distribution, characteristics and diagnostic methods for fire blight (*Erwinia amylovora*) in the Russian Federation. In: 13th ISHS International Fire Blight Workshop abstract book, 2013, p.25.
131. Kim J. F., Wei, Z. M., Beer, S. V. The hrpA and hrpC operons of *Erwinia amylovora* encode components of a type III pathway that secretes harpin. In: J. of Bacteriology, 1997, vol. 179, p. 1690-1697.
132. Kim W.-S., K. Geider. Characterization of a viral EPS-depolymerase, a potential tool for control of fire blight. In: Phytopathology, 2000, vol. 90, p.1263-1268.

133. Koczan J. M. et al. Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: implications in pathogenicity. In: *Phytopathology*, 2009, vol.99, nr .11, p.1237-1244.
134. Koskella B. Phage-mediated selection on microbiota of a long-lived host. In: *Curr Biol.* 2013, vol. 23, nr. 13, p. 1256-1260.
135. 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.
136. Koskella B. et al. The costs of evolving resistance in heterogeneous parasite environments. In: *Proc of the Royal Society. Biological Sciences.* 2012, vol. 279, nr 1735, p.1896-1903.
137. Koskella B., Meaden S. Understanding bacteriophage specificity in natural microbial communities. In: *Viruses*, 2013, vol. 5, nr. 3, p. 806-823.
138. Koskella B., et al. Using experimental evolution to explore natural patterns between bacterial motility and resistance to bacteriophages. In: *The ISME Journal*, 2011, nr. 5, p. 1809–1817.
139. Krupovic M. et al. Genomics of bacterial and archaeal viruses: dynamics within the prokaryotic virosphere. In: *Micr. and Mol. Biology Review*, 2011, vol.75, nr.4. p. 610–635.
140. Kunz S. Field results for the efficacy of fire blight control agents in the last 15 years in Germany. In: *13th ISHS International Fire Blight Workshop abstract book*, 2013, p.28.
141. Lagonenko A. L. et al. First report of *Erwinia amylovora* fire blight in Belarus. In: *Journal of Phytopathology*, 2008, vol.156, nr. 10, p. 638-640.
142. Lawrence J.G., Hatfull G.F., Hendrix R.W. Imbroglis of viral taxonomy: genetic exchange and failings of phenetic approaches. In: *J. of Bacteriology*, 2002, vol.184, nr. 17, p. 4891-4905.
143. 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.
144. Lehman S. M. et al. Complete genome of the broad-host-range *Erwinia amylovora* phage Φ Ea21-4 and its relationship to *Salmonella* phage Felix O1. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, vol. 75, nr. 7, p. 2139-2147.
145. Lešnik M., Kurnik V., Gaberšek V. Phytotoxicity on apple flowers of copper formulations applied for the control of blossom blight. In: *Acta Hort. (ISHS)*, 2011, vol.896, p.495-501.
146. Leverentz B. et al. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, vol. 69, nr. 8, p. 4519-4526.
147. Li J., Dennehy J.J. Differential bacteriophage mortality on exposure to copper. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, vol. 77, nr. 19. p. 6878-6883.

148. Lindow S. E., Suslow T. V. Temporal dynamics of the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* strain A506 in flowers in inoculated pear trees. In: *Phytopathology*, 2003. vol. 93, nr. 6, p. 727-737.
149. Loeffler J.M., Nelson D., Fischetti V.A. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. In: *Science*, 2001, vol. 294, p. 2170–2172.
150. Loncaric I. et al. Strain-specific detection of two *Aureobasidium pullulans* strains, fungal biocontrol agents of fire blight by new, developed multiplex-PCR. In: *Journal of Applied Microbiology*, 2008, vol.104, p. 1433–1441.
151. Llop P. et al. An indigenous virulent strain of *Erwinia amylovora* lacking the ubiquitous plasmid pEA29. In: *Phytopathology*, 2006, vol. 96, nr. 8, p.900-907.
152. Llop P. et al. *Erwinia amylovora* novel plasmid pEI70: complete sequence, biogeography, and role in fire blight Phytopathogen. In: Yang C-H, ed. *PLoS ONE* 2011, vol. 6, nr. 12:e28651. doi:10.1371/journal.pone.0028651
153. Ma W. et al. Molecular characterization of global regulatory RNA species that control pathogenicity factors in *Erwinia amylovora* and *Erwinia herbicola* pv. *Gypsophila*e. In: *Journal of Bacteriology*, 2001, vol. 183, nr. 6, p. 1870–1880.
154. Maes M. et al. Influence of amylovoran production on virulence of *Erwinia amylovora* and a different amylovoran structure in *E. amylovora* isolates from *Rubus*. In: *European Journal of Plant Pathology*, 2001, vol. 107, nr. 8, p 839-844.
155. Magher M., Kostru M. Fire blight of fruit cultures in the Republic of Moldova. In: *Фітопатогенні бактерії. Фітонцидологія. Алелопатія: Збірник статей учасників міжнар. наукової конференції, м. Київ, 2005, с. 68-70.*
156. Malnoy M. et al. Expression of viral EPS-depolymerase reduces fire blight susceptibility in transgenic pear. In: *Plant Cell Reports*, 2005, vol.23, nr. 9, p.632-638.
157. McGhee G.C., Jones A.L. Complete nucleotide sequence of ubiquitous plasmid pEA29 from *Erwinia amylovora* strain Ea88: gene organization and intraspecies variation. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, vol.66, nr. 11, p.4897-4907.
158. McGhee G.C., Sundin G.W. *Erwinia amylovora* CRISPR elements provide new tools for evaluating diversity and microbial source tracking. In: *Acta Hort. (ISHS)*, 2011, vol. 896, p.99-107.
159. McGhee G.C., Sundin G. W. Kasumin: field results for fire blight management and evaluation of the potential for spontaneous resistance development in *Erwinia amylovora*. In: *Acta Horticulturae (ISHS)* 2011, vol.896, p.519-525.
160. McLeod S.M. et al. CTXphi and *Vibrio cholerae*: exploring a newly recognized type of phage-host cell relationship. In: *Molecular Microbiology*, 2005, vol. 57, nr. 2, p.347-356.
161. McNair K., Bailey B. A., Edwards R. A. PHACTS, a computational approach to classifying the lifestyle of phages. In: *Bioinformatics*, 2012, vol. 28, nr. 5, p. 614–618.

162. Meaden S., Koskella B. Exploring the risks of phage application in the environment. *Frontiers in Microbiology*. 2013, vol. 4, nr. 358. doi:10.3389/fmicb.2013.00358
163. Meczker K. et al. The genome of the *Erwinia amylovora* phage PhiEaH1 reveals greater diversity and broadens the applicability of phages for the treatment of fire blight. In: *FEMS Microbiology Letters*, 2014, vol.350, nr. 1, p. 25-27.
164. Meng X. et al. Apple proteins that interact with DspA/E, a pathogenicity effector of *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2006, vol. 19, p. 53–61.
165. Metzger M. et al. Genetics of galactose metabolism of *Erwinia amylovora* and its influence on polysaccharide synthesis and virulence of the fire blight pathogen. In: *Journal of Bacteriology*, 1994, vol.176, nr. 2, p.450-459.
166. Mikiciński A. et al. *Pseudomonas graminis* as a biocontrol agent of fire blight. In: *Acta Horticulturae (ISHS)* 2011, vol. 896, p. 471-476.
167. Mizuno A., Sato S., Kawai A. Serological differences among *Erwinia amylovora* biovars. In: *Journal of General Plant Pathology*, 2002, vol. 68, nr. 4, p. 350-355.
168. Molina L. et al. Autoinduction in *Erwinia amylovora*: evidence of an acyl-homoserine lactone signal in the fire blight pathogen. In: *J. of Bacteriology*, 2005, vol. 187, nr. 9, p. 3206-3213.
169. Moročko-Bičevska I., Maldute S. Fire blight in Latvia: occurrence, management and problems. In: *13th ISHS Int. Fire Blight Workshop Abstract Book*, 2013, p.71.
170. Mourgues F., Brisset M.-N., Chevreau E. Activity of different antibacterial peptides on *Erwinia amylovora* growth, and evaluation of the phytotoxicity and stability of cecropins. In: *Plant Science*, 1998, nr. 139, p. 83-91.
171. Müller I., et al. Complete genome sequences of three *Erwinia amylovora* phages isolated in North America and a bacteriophage induced from an *Erwinia tasmaniensis* strain. In: *Journal of Bacteriology*, 2011a, vol.3, nr. 193, p. 795–796.
172. Müller I., et al. Molecular and physiological properties of bacteriophages from North America and Germany affecting the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. In: *Microbial Biotechnology*, 2011b, vol.4, nr. 6, p. 735–745.
173. National Center for Biotechnology Information <http://ncbi.nlm.nih.gov/> (visited 2.05.13)
174. Nicolaev A.N., Laux P., Zeller W. Fire blight in the Republic of Moldova: present status of its occurrence and characteristics of its pathogen *Erwinia amylovora*. In: *Acta Hort*, 2002, nr. 590, p. 95-98.
175. Nimtz M. et al. Structure of amylovoran, the capsular exopolysaccharide from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. In: *Carbohydrate Research*, 1996, nr. 287, p. 59–76.
176. Ngugi H.K., Lehman B.L., Madden L.V. Multiple treatment meta-analysis of products evaluated for control of fire blight in the eastern United States. In: *Phytopathology* 2011, vol. 101, p.512-522.

177. Oh C.S, Beer S.V. Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. In: FEMS Microbiology Letters, 2005, nr. 253, p. 185–192.
178. Okabe N., Goto, M. Bacteriophage of plant pathogens. In: Annual Review of Phytopathology, 1963, vol. 1, p.397-418.
179. Ordax M. et al. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against Copper: induction of the viable-but-nonculturable state. In: Appl. and Environmental Microbiology, 2006, vol. 72, p. 3482-3488.
180. Ozaktan H. et al. Integrated control of fire blight in a pear orchard in Turkey using prohexadione-Ca and bacterial antagonists. In: Acta Hort. (ISHS), 2011, vol.896, p.441-446.
181. 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: November 6 2014
<http://www.freepatentsonline.com/WO2014177996A1.html>. (visited 20.11.2014)
182. Pester D. et al. *Erwinia amylovora* expresses fast and simultaneously hrp/dsp virulence genes during flower infection on apple trees. PLoS ONE, 2012, vol. 7, nr. 3: e32583. doi:10.1371/journal.pone.0032583
183. Pflüger V. et al. MALDI-TOF as tool to distinguish species in *Erwinia* and related genera. In: 13th ISHS International Fire Blight Workshop abstract book, 2013, p. 44.
184. Phillion V. et al. Antagonistic interaction between the biocontrol agent BlightBan C9-1 and the plant defense elicitor Actigard. In: Acta Hort. (ISHS), 2011, vol. 896, p. 437-440.
185. PM 7/20 (2)* *Erwinia amylovora*, 2013. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2013, vol. 43, nr. 1, p.21-45.
186. Proux C. et al. The dilemma of phage taxonomy illustrated by comparative genomics of Sfi21-like *Siphoviridae* in lactic acid bacteria. In: J. of Bacteriology, 2002, vol.184, nr. 21, p. 6026-6036.
187. Pujoi M. et al. Assessment of the environmental fate of the biological control agent of fire blight, *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, on apple by culture and real time PCR methods. In: Applied and Environmental Microbiology, 2006, vol. 72, nr. 4, p. 2421-2427.
188. Pusey P.L. Effect of nectar on microbial antagonists evaluated for use in control of fire blight of pome fruits. In: Phytopathology, 1999, vol. 89, nr. 1, p. 39-46.
189. Pusey P.L., Curry E.A. Temperature and pomaceous flower age related to colonization by *Erwinia amylovora* and antagonists. In: Phytopathology 2004, vol.94, p.901-911.
190. Pusey P.L., Stockwell V.O., Rudell D.R. Antibiosis and acidification by *Pantoea agglomerans* Strain E325 may contribute to suppression of *Erwinia amylovora*. In: Phytopathology, 2008, vol. 98, nr.10, p. 1136-1143.
191. Pusey P.L., Smith T.J. Relation of apple flower age to infection of hypanthium by *Erwinia amylovora*. In: Plant Disease, 2008, nr. 92. p. 137-142.

192. Rezzonico F., Duffy B. The role of luxS in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* is limited to metabolism and does not involve quorum sensing. In: Molecular Plant Microbe Interactions, 2007, vol. 20, nr. 10, p.1284-1297.
193. Rico A. et al. Genetic characterization of *Erwinia amylovora* strains by amplified fragment length polymorphism. In: Journal of Applied Microbiology, 2004, vol. 96, p. 302-310.
194. Ritchie D.F., Klos E.J. Isolation and partial characterization of *Erwinia amylovora* bacteriophage from aerial parts of apple trees. In: Phytopathology, 1977, vol. 67, p. 101-104.
195. Roach D. R. et al. Host exopolysaccharide quantity and composition impact *Erwinia amylovora* bacteriophage pathogenesis. In: Applied and Environmental Microbiology, 2013, vol.79, nr. 10, p. 3249–3256.
196. Rohwer F., Edwards R. The phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage. In: Journal of Bacteriology, 2002, vol. 184, nr. 16, p.4529-4535.
197. Ruz L., Moragrega C., Montesinos E. Evaluation of four whole-plant inoculation methods to analyze the pathogenicity of *Erwinia amylovora* under quarantine conditions. In: Int Microbiol. 2008, vol. 11, nr. 2, p.111-119.
198. Samoilova A. V., Leclerque A. PCR-based identification of *Erwinia amylovora* bacteriophages isolated in the Republic of Moldova. In: J. of Virology and Microbiology.2014, p. 1-7. ISSN 2326-7011
199. Saccardi A. et al. *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* control trials with phage treatments on peaches in the orchard. In: Phytopathologia Mediterranea, 1993, vol. 32, p. 206–210.
200. Salm H., Geider K. Dual Activity of a viral lysozyme with high efficiency for growth inhibition of *Erwinia amylovora*. In: Phytopathology, 2004, vol. 94, nr. 12, p. 1315-1322.
201. Schnabel E.L. et al. Bacteriophage of *Erwinia amylovora* and their potential for biocontrol. In: Acta Hort. (ISHS), 1999, vol. 489, p.649-654.
202. 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.
203. Schoofs H. et al. Fire blight control strategy in Belgium. In: 13th ISHS International Fire Blight Workshop abstract book, 2013, p.23.
204. Schwarczinger I. et al. Control of fire blight by bacteriophages on apple flowers. In: Acta Horticulturae (ISHS) 2011, vol. 896, p.457-462.
205. Serwer P., et al. Improved isolation of undersampled bacteriophages: finding of distant terminase genes. In: Virology, 2004, nr. 329, p. 412–424.

206. Sobiczewski P. et al. The importance of the type of *Erwinia amylovora* inoculum in screening of apple genotypes susceptibility to fire blight. In: Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 2008, vol. 16, p. 305-313.
207. Sobiczewski P., Mikiciński A., Stokowski A. Necrotrophic survival of *Erwinia amylovora* in apple leaf tissue. In: 13th ISHS Int. Fire Blight Workshop abstract Book, 2013, p.26.
208. Smith T. J. Fire blight: barriers to control in the past and present; future control strategies. In: 13th ISHS Int. Fire Blight Workshop abstract book, 2013, p.17-18.
209. Smits T.H., Duffy B. Genomics of iron acquisition in the plant pathogen *Erwinia amylovora*: insights in the biosynthetic pathway of the siderophore desferrioxamine E. In: Archives of Microbiology, 2011, vol. 193, nr. 10, p. 693-699.
210. Smits T.H.M. et al. Genome sequence of the biocontrol agent *Pantoea vagans* strain C9-1. In: Journal of Bacteriology, 2010, vol.192, nr. 24, p. 6486-6487.
211. Steinberger E.M., Beer S.V. Creation and complementation of pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora*. In: Mol. Plant-Microbe Interactions, 1988, vol. 1, p. 135-144.
212. Stockwell V. Addressing concerns surrounding antibiotic use for control of fire blight. In: 13th ISHS International Fire Blight Workshop abstract book, 2013, p. 19.
213. Stonier T., McSharry J., Speitel T. *Agrobacterium tumefaciens* Conn. IV. Bacteriophage PB21 and its inhibitory effect on tumor induction. In: J. of Virology, 1967, vol 1, nr. 2, p. 268-273.
214. Tampakaki A.P. et al. Playing the “Harp”: Evolution of our understanding of hrp/hrc genes. In: Annual Review of Phytopathology, 2010, nr. 48, p. 347-370.
215. Tamura K. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. In: Molecular Biology and Evolution, 2011, nr. 28, p. 2731-2739.
216. Tanaka H., Negishi H., Maeda H. Control of tobacco bacterial wilt by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* M4S and its bacteriophage. In: Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1990, vol. 56, nr. 2, p. 243-246.
217. Tawfik A.E. et al. Efficacy of some plant extracts on the growth of streptomycin resistant and sensitive isolates of *Erwinia amylovora*. In: Acta Hort. (ISHS), 2011, nr. 896, p.477-481.
218. Tharaud M. et al. Fire blight protection with avirulent mutants of *Erwinia amylovora*. In: Microbiology, 1997, vol. 143, p. 625-632.
219. Triplett L.R., Zhao Y., Sundin G.W. Genetic differences between blight-causing *Erwinia* species with differing host specificities, identified by suppression subtractive hybridization. In: Applied and environmental microbiology, 2006, vol. 72 nr.11, p. 7359-7364.

220. Tunali N., Mirik M. The detection of *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al. strains, causing fire blight in pome fruit trees in Bursa. In: 13th ISHS International Fire Blight Workshop abstract book, 2013, p.71.
221. Valentini F., Krasniqi N., Djelouah K. Assessment of the sanitary status of pome fruit crops in Kosovo, with particular emphasis to the bacterial disease the fire blight. In: 13th ISHS International Fire Blight Workshop abstract book, 2013, p.71.
222. 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.
223. Van der Zvet T., Keil H. Fire blight: a bacterial disease of rosaceous plants. U.S. Department of Agriculture, Washington D.C., 1979. P. 200.
224. Vandenberg P.A., Cole R.L. Cloning and expression in *Escherichia coli* of polysaccharide depolymerase associated with bacteriophage-infected *Erwinia amylovora*. In: Applied and Environmental Microbiology, 1986, vol. 51, nr. 4, p.862-864.
225. Vandenberg P.A., Wright A.M., Vidaver A.K. Partial purification and characterization of a polysaccharide depolymerase associated with phage-infected *Erwinia amylovora*. In: Applied and Environmental Microbiology, 1985, vol.49, nr. 4, p.994-996.
226. Walters M., Sperandio V. Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: Infection and Immunity, 2006, vol. 74, nr. 10, p.5445-5455.
227. Walsh F. et al. Streptomycin use in apple orchards did not adversely alter the soil bacterial communities. In: 13th ISHS Int. Fire Blight Workshop abstract book, 2013, p.68.
228. Wang, D., et al. Genome-wide identification of genes regulated by the Rcs phosphorelay system in *Erwinia amylovora*. In: Mol. Plant Microbe Interact.. 2012. Nr. 25, p.6-17.
229. Wang D., Korban S.S., Zhao Y. Molecular signature of differential virulence in natural isolates of *Erwinia amylovora*. In: Phytopathology, 2010, vol.100, nr .2, p.192-198.
230. Wei Z. M. et al. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. In: Science, 1992, vol.257, p.85-88.
231. 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.
232. Wensing, A. et al. 6-thioguanine biosynthesis in *Erwinia* species. In: Acta Hort. (ISHS) 2014, nr. 1056, p.165-167.
233. Whitehead N.A. et al. The regulation of virulence in phytopathogenic *Erwinia* species: quorum sensing, antibiotics and ecological considerations. In: Antonie Van Leeuwenhoek, 2002, vol. 81, nr. 1-4, p.223-231.

234. Wilson M. Lindow S. E. Interactions between the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Erwinia amylovora* in pear blossoms. In: Phytopathology, 1992, vol. 83, p. 117-123.
235. Wittmann J., Eichenlaub R., Dreiseikelmann B. The endolysins of bacteriophages CMP1 and CN77 are specific for the lysis of *Clavibacter michiganensis* strains. In: Microbiology, 2010, nr.156, p. 2366–2373.
236. Witzany G. Biocommunication in soil microorganisms, Springer-Verlag, Heidelberg. 2011. P.476.
237. Wright S.A.I. et al. *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* *in vitro*. In: Appl. and Environmental Microbiology, 2001, vol. 67, nr. 1, p.284-292.
238. Zhang Y. Molecular characterization of a protease secreted by *Erwinia amylovora*. In: Journal of Molecular Biology, 1999, vol. 289, nr. 5, p.1239-1251.
239. Zhao Y., Blumer S.E., Sundin G.W. Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue. In: J. of Bacteriology, 2005, vol. 187, nr. 23, p. 8088-8103.
240. Zhao Y., Qi M. Comparative genomics of *Erwinia amylovora* and related *Erwinia* species—what do we learn? In: Genes, 2011, vol. 2, nr. 3, p.627-639.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Акт о внедрении (Молдавский Государственный Университет)

MINISTERUL EDUCAȚIEI al
REPUBLICII MOLDOVA
UNIVERSITATEA DE STAT DIN
MOLDOVA



МИНИСТЕРСТВО ПРОСВЕЩЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ МОЛДОВА
МОЛДАВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

MD-2009, Chișinău str. A. Mateevici, 60
tel: 57-74-01, fax (373-22) 24-42-48

MD-2009, Кишинэу ул. А. Матеевич, 60 тел:
57-74-01, факс (373-22) 24-42-48

CERTIFICAT

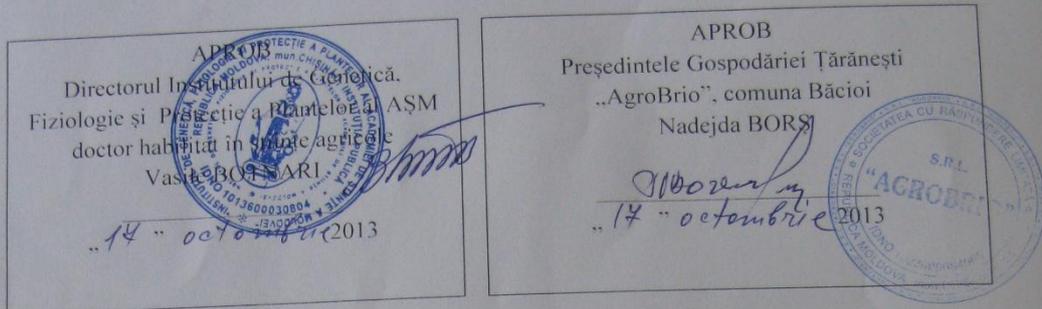
Prin prezentul, se confirmă că rezultatele științifice ale Doamnei Anna Samoilova, Cercetător Științific al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, publicate în revista Mediul ambiant, culegerea de lucrări științifice „Protecția plantelor: realizări și perspective” și expuse în teza de doctor în științe biologice intitulată „Fundamentarea biologică a aplicării bacteriofagilor în combaterea Focului bacterian al rozaceelor”, cât și din alte lucrări, sunt folosite în procesul didactic la cursul normativ “Virusologia” pentru studenții anului II, ciclul I Licență ai Facultății de Biologie și Pedologie a Universității de Stat din Moldova.

Decanul Facultății de Biologie și Pedologie,
doctor în științe biologice,
conferențiar universitar

Leșanu Mihail



Приложение 2. Акт о внедрении (Хозяйство «АgroBrio»)



ACT

de avizare a producției tehnico-științifice și a rezultatelor înregistrate

Denumirea temei: Elaborarea mijloacelor ecologic inofensive în baza microorganismelor utile și a substanțelor biologice active pentru combaterea organismelor dăunătoare în agrocenoze.

Etapă: Izolarea, identificarea și ameliorarea sușelor utile de microorganisme necesare pentru elaborarea tehnologiilor de producere a preparatelor baculovirale, bacteriene și micotice.

Sub-etapă: Argumentarea biologică a posibilității de aplicare a bacteriofagilor în combaterea focului bacterian al culturilor pomicele

Perioada testării: aprilie 2012 - octombrie 2013.

Conducătorul științific: Leonid Voloșciuc, șef al Laboratorului de Fitopatologie și Biotehnologie.

Executori:

Din partea IGFP al AȘM – cercetător științific Samoilova Anna.

Din partea agentului economic: Conducătorul gospodăriei agricole Nadejda Borș.

Descrierea obiectului contractului: Aplicarea bacteriofagilor 605Cy1-a la tratarea plantelor de măr în combaterea focului bacterian al rozaceelor

Denumirea gospodăriei agricole și locul executării experiențelor: „AgroBrio”, comuna Băcioi, raionul Ialoveni Conducătorul gospodăriei agricole Nadejda Borș.

Metoda efectuării experimentelor: Tratare a plantelor de măr cu lizat de bacteriofagi 605Cy1-a în perioada de înflorire (luna mai), în perioada de creștere a lăstarilor (luna iunie) și în luna octombrie, în concentrație 10^7 particulele virale/ml.

Prin prezentul act se atestă activitatea biologică a bacteriofagilor testați asupra arsurii bacteriene a rozaceelor, ceea ce demonstrează necesitatea continuării cercetărilor la această temă.

Semnăturile părților:



Din partea IGFP al AȘM,
Leonid Voloșciuc



Din partea gospodăriei agricole
„AgroBrio”
Borș Nadejda

Декларация об ответственности

Нижеподписавшийся, заявляю под личную ответственность, что материалы, представленные в докторской диссертации, являются результатом личных научных исследований и разработок. Осознаю, что в противном случае, буду нести ответственность в соответствии с действующим законодательством.

Фамилия, имя

Самойлова Анна

Подпись

Число

24.05.2016

CURRICULUM VITAE

Анна Самойлова

Дата и место рождения

14 сентября 1971, Республика Молдова, г. Кишинев

Гражданство Республика Молдова

Образование

1994 - 1999 аспирант, Институт биологических методов защиты растений Академии Наук Республики Молдова, вирусология, биотехнология, защита растений

1989-1994 Национальный лесотехнический университет Украины, Львов, Украина

Специальность: садово-парковое строительство



Стажировки

Институт биологической защиты растений, Дармштадт, Германия 05 – 07. 2013
изучение метода ПЦР для идентификации микроорганизмов (грибы, бактерии, бактериофаги)

Область научных интересов

Вирусы растений, разработка методов борьбы с вирусами розы эфиромасличной в культуре *in vitro*; фитопатогенные бактерии, вирусы фитопатогенных бактерий, выделение и идентификация бактериофагов фитопатогенных бактерий

Участие в национальных и международных научных проектах

Грант 01DK12005 Федерального Министерства Образования и Исследований Ф РГ (German Federal Ministry of Education and Research), 2013

Профессиональная деятельность

2014 научный сотрудник, лаборатория фитопатологии и биотехнологии, Институт генетики, физиологии и защиты растений Академии Наук Республики Молдова

06. 2012 научный сотрудник, лаборатория биотехнологии микробиологических средств защиты растений, Институт защиты растений и экологического земледелия Академии Наук Республики Молдова

04.1999-05.2012 младший научный сотрудник. лаборатория биотехнологии микробиологических средств защиты растений, Институт защиты растений и экологического земледелия Академии Наук Республики Молдова

1994-1999 старший лаборант, лаборатория биотехнологии, Институт биологических методов защиты растений, Академии Наук Республики Молдова

Участие в научных форумах

Научно-практические конференции:

«Интегрированная защита растений – стратегия и тактика» (Минск 2011),
«Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем» (Краснодар, 2012),

Международные симпозиумы:

«Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем».
(Краснодар, 2004).

«Синантропизация растений и животных» (Иркутск, 2007),

«Защита растений – достижения и перспективы» (Кишинев, 2009),

«Защита растений: проблемы и перспективы» (Кишинэу, 2012),

Семинар «Pathogens and antagonists: the multiple role of bacteria in biological plant protection», Kyrgyz-Uzbek-Kazakh-German multilaterated programme for cooperation BIOPROTECT (Bishkek, Almaty, 2014),

XVIII Международный Конгресс по защите Растений. International Plant Protection Congress Mission possible: food for all through appropriate plant protection (Berlin, 24-27 August 2015),

Международный симпозиум «Защита растений – достижения и перспективы»,
(Кишинев, 27-28 октября 2015).

Международный симпозиум “Genetics for Biocontrol”, Geisenheim, Germany, 12.
November, 2015.

Научные и научно-методические публикации

1 статья в международном журнале, 1 статья в журнале категории C, 3 статьи в международных сборниках, 5 статей в национальных сборниках, 2 тезисов научных форумов

Премии

Диплом за разработку биологических средств защиты от бактериозов сельскохозяйственных культур, ноябрь 2014

Участие в профессиональных организациях

Общество защиты растений, Республика Молдова

Знание языков

Русский

Английский

Украинский

Румынский

Адрес MD 2002 Кишинэу, ул. Пэдурий 28

Телефон +373 069265050

E- mail anna.v.samoilova@gmail.com