

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Міністерство освіти і науки України  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**КОРНІЄНКО НАТАЛІЯ ОЛЕГІВНА**

УДК 578.4+578.5+579.69

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ВІРУСИ БАКТЕРІЙ РОДИН *ENTEROBACTERIACEAE* ТА  
*PSEUDOMONADACEAE* ЯК ПОТЕНЦІЙНІ СКЛАДОВІ  
ПРОТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ**

Спеціальність – 091 «Біологія»

Галузь знань – 09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі біології

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело \_\_\_\_\_ Корнієнко Н.О.

Науковий керівник: Будзанівська Ірина Геннадіївна, доктор біологічних наук, професор.

Київ – 2023

## АНОТАЦІЯ

Корнієнко Н.О. **Віруси бактерій родин *Enterobacteriaceae* та *Pseudomonadaceae* як потенційні складові протимікробних препаратів** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії (кандидат біологічних наук) за спеціальністю 091 «Біологія» (09 – Біологія) – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Міністерство освіти і науки України, – Київ, 2023.

Дисертаційну роботу присвячено дослідженню літичних властивостей специфічних вірусів бактерій (бактеріофагів) родин *Enterobacteriaceae* та *Pseudomonadaceae*. У дисертаційній роботі було проведено виділення та характеристику бактеріофагів, специфічних до поширених збудників бактеріозів, досліджені їх біологічні та генетичні властивості, розроблено схему взаємодії фагів з бактеріями в умовах *in planta* та досліджено вплив фагів на первинну ланку імунної відповіді рослин.

Актуальність теми кваліфікаційної роботи зумовлена необхідністю пошуку та дослідження нових літичних бактеріофагів, специфічних до фітопатогенних бактерій-представників родин *Enterobacteriaceae* та *Pseudomonadaceae*, які є широко поширеними збудниками фітобактеріозів в Україні. Протимікробна дія фагів добре досліджена *in vitro*, проте існує велика прогалина в дослідженнях *in planta*, як в Україні, так і в світі. Проблематичним також є різноманіття методів дослідження ефективності бактеріофагів проти їх хазяїнів *in planta*, внаслідок чого результати порівняння результатів експериментів ускладнюється. Малодослідженим є вплив сумісного навантаження бактеріофага та бактерії на імунну відповідь рослин.

Пошук бактеріофагів, специфічних до збудників бактеріозів, які викликають хвороби важливих для сільського господарства культур рослин –

актуальне завдання для України, сільськогосподарська галузь якої до сих пір лишається важливою для економіки як нашої держави, так і Європи. Згідно з нормами ЄС і вимогами до чистоти продуктів рослинництва від хімічно- та біологічно-активних речовин проти збудників фітобактеріозів рослин не рекомендовано використовувати антибіотики, тому пошук альтернативних засобів боротьби із бактеріозами є важливим завданням для науковців. Одним із найбільш ефективних і багатообіцяючих засобів боротьби із фітопатогенними мікроорганізмами є літичні, специфічні до збудника бактеріофаги (фаги).

На даний момент для моделювання потенціалу фагів в лабораторних умовах і польових випробуваннях були використані різні підходи і методи. Станом на сьогоднішній день досі не прийнято стандартний протокол для оцінки ефективності терапевтичної дії фагів. Деякі дослідження покладаються на візуальну оцінку симптомів, інші зосереджуються на біомасі рослин, в той час як тільки рідкісні роботи враховують кількість бактерії та/або фагів в тканинах. Додатковою проблемою практичного застосування фаготерапії є відсутність знань про можливі взаємодії між фагами та рослинами. Прийнято вважати, що фаги не взаємодіють безпосередньо з рослинами, однак у рослин вже було виявлено ряд фагоподібних генів.

Завданнями нашого дослідження було ізолювати та охарактеризувати літичні бактеріофаги, специфічні до збудників фітобактеріозів *Pantoea agglomerans*, *Serratia marcescens* та *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, охарактеризувати їх, провести перевірку їхньої здатності до пригнічення фітобактеріозів в лабораторних умовах, а також дослідити їхній вплив на імунний стан рослин. Дослідження цих питань є важливим для успішного застосування фагів у терапії та профілактиці фітобактеріозів не тільки в Україні, але й у світі, і має пролити світло на взаємовідносини фага і рослини.

У роботі застосовано класичні вірусологічні, мікробіологічні, сучасні молекулярно-генетичні методи дослідження і методи з галузі фізіології рослин, а саме: встановлення антибіотикорезистентності бактерій диско-дифузійним методом, біохімічна характеристика бактерій за допомогою селективних середовищ та наборів для біохімічної ідентифікації, виділення бактеріофагів методом збагачення, диференційне центрифугування, перевірка активності фагів методом подвійних агарових шарів та спот-тесту, визначення стійкості фагів до дії інактивуючих агентів (температури, рН), інокуляція *Arabidopsis thaliana* методами флад-інокуляції, інфільтрації, інокуляції в рідкому середовищі, електронна мікроскопія, спектрофотометрія, GUS-гістохімічний аналіз, секвенування бактеріофагів методом Ion Torrent, статистичні методи.

При виконанні дисертаційного дослідження вперше в Україні виділено та накопичено бактеріофаги, специфічні до *P. agglomerans* (попередньо виділеної з рослин перцю із симптомами бактеріозу та визначеною за допомогою біохімічних тестів), *S. marcescens* та *P. syringae* pv. *tomato* DC 3000 (*Pst*) (обидві культури були взяті із лабораторних колекцій). Всі бактеріофаги було очищено та накопичено, охарактеризовано морфологічно із застосуванням електронного мікроскопу. За морфологічними характеристиками фаговий ізолят Eh1, специфічний до *P. agglomerans*, та фаг 4S, специфічний до *S. marcescens*, мають морфотипи, типові для міоподібних вірусів. Ізоляти бактеріофагів Eir4 та Eisa9, специфічні до *Pst*, мають типову морфологію подовірусів і за результатами генетичного аналізу належать до родини *Autographiviridae* (1). Геном фагу 4S повністю секвеновано і завантажено до світового генетичного банку GenBank NCBI (accession number MW082584) (2). Результати порівняння з нуклеотидними послідовностями інших фагів, специфічних до *S. marcescens*, показали, що найбільш спорідненим до *Serratia* phage 4S фагом є *Serratia* phage CBH8. Результати

філогенетичного аналізу МСР (головного капсидного білка) фага *Serratia phage 4S* показали, що його послідовність МСР була найбільш гомологічна до послідовностей МСР фагів *Acinetobacter* і *Enterobacter*. Філогенетичний аналіз послідовності ДНК-гелікази *Serratia phage 4S* показав, що вона найбільш гомологічна до послідовностей ДНК-гелікази фагів *Yersinia* і *Enterobacter*. Бактеріофаги Eir4 та Eisa9, специфічні до *Pst*, були перевірені на стійкість до різних температур та рН. Фаги лишалися стабільними за температури від 4°C (температура інкубації) до 26°C (температура для росту *Pst*) та за рН 7-9. Кінетику лізису фагами Eir4 та Eisa9 бактерії *Pst* було досліджено на спектрофотометрії і виявлено, що фаг Eir4 повністю лізував бактерію в середовищі вже після 80 хвилин ко-інкубації, а Eisa9 - після 125 хвилин, при цьому утримуючи концентрацію бактерій на стабільному рівні, що свідчить про специфічні та відмінні від звичайних літичних фагів взаємовідносини з хазяїном.

Досліджувані бактеріофаги перевірено на здатність лімітувати ріст бактерій у рослинних тканинах. Здатність ізоляту Eh1 пригнічувати розвиток фітобактеріозу, спричиненого *P.agglomerans*, перевірена за допомогою методу інокуляції картопляних дисків, а фагу *Serratia phage 4S* – шляхом інокуляції лусок цибулі *Allium cepa*. Оцінка ефективності проводилась візуально за наявністю симптомів. Виділені нами бактеріофаги продемонстрували ефективність проти *P.agglomerans* та *S.marcescens* в попередженні викликаного ними бактеріозу, оскільки на інокульованих рослинних зразках не спостерігались типові для даних патогенів симптоми. Це свідчить про їхній потенціал як складових фагового препарату, а наявність повногеномного сиквенсу *Serratia phage 4S* робить цей вірус повноправним кандидатом для таких препаратів, оскільки це є необхідною умовою для використання вірусів у терапії.

Для дослідження механізмів взаємодії між рослинами, патогенними бактеріями і фагами використано модельну систему *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*), два специфічних бактеріофаги і рослини *A. thaliana*. Бактерія і рослина в цій системі є досконало вивченими організмами, тому ми скористалися цією можливістю і вперше відтворили всі стандартні методи інокуляції *A. thaliana*, щоб перевірити вплив одночасного навантаження бактеріофага та бактерії на рослинний організм. Першим методом було обрано флад-інокуляцію, за якою двотижневі рослини арабідопсиса, вирощені на чашках Петрі з напівтвердим середовищем Murashige&Skoog (MS) оброблялись бактерією та сумішшю бактерії та фага. Фаг Eir4 не лізував всі бактеріальні клітини, але значно понизив концентрацію бактерії в зразках. У триденному експерименті за цим методом фаг Eir4 показав високу ефективність в пригніченні розвитку фітобактеріозу у перший та другий день після інокуляції. Концентрація *Pst* в рослинах, інфікованих сумішшю з Eisa9, не відрізнялась від рослин, інфікованих лише *Pst*.

За результатами інокуляції рослин арабідопсису методом інфільтрації обидва фага виявились неефективними в пригніченні росту *Pst*, оскільки її концентрація лишалась високою - на рівні з бактеріальним контролем в усіх групах рослин, включно з інокульованими фагами. Ймовірно, через інактивацію фагу внаслідок дії рослинних протеаз та відносно несприятливе середовища в апопласті, протимікробна активність фагів була слабкою, хоча віруси були виділені з інокульованих листків навіть через 4 доби після інокуляції. Отже, ми не можемо рекомендувати даний метод для первинної оцінки активності фага *in planta* через лімітовану здатність вірусів інфікувати бактеріальні клітини всередині рослинного організму.

За результатами інокуляції десятиденних рослин арабідопсиса в рідкому MS середовищі (у 24-лункових плашках), фаг Eir4 успішно лімітував ріст *Pst* як в групах, оброблених сумішшю фаг-бактерія, так і в групах, де фаг був

внесений превентивно за добу до інокуляції *Pst*. Метод інокуляції у рідкому середовищі виявився найбільш ефективним для первинного дослідження ефективності фагів у пригніченні росту бактерій, швидким у порівнянні з іншими опрацьованими нами методами (час проведення експерименту до 12 днів) і може бути рекомендований, як базовий метод первинної оцінки активності фагів.

Вперше продемонстровано вплив спільного навантаження фага та бактерії *Pst* на імунну відповідь *A.thaliana* за допомогою методу GUS-гістохімічного аналізу листків мутантів арабідопсису PR1::GUS та FRK1::GUS, інокульованих бактерією та сумішшю з фагом шляхом інфільтрації. Показано, що фаг не індукуює експресію генів ранньої імунної відповіді *PR1* та *FRK1*, а суміш фага та бактерії могла викликати сильнішу відповідь за рахунок лізису бактерії або пошкодження листкової пластинки у випадку інфільтрації. При інокуляції у рідкому середовищі у рослин, оброблених сумішшю фага та бактерії, інтенсивність забарвлення була статистично нижча за бактеріальний контроль, а у рослин, оброблених лише фагом, не відрізнялась від такої у групі, інокульованої буфером 10 mM MgCl<sub>2</sub> (негативний контроль).

Виділено стійкі до фагів Eir4 та Eisa9 ізоляти *Pst*. Досліджена зміна здатності чотирьох ізолятів (Res1, Res2, Res3, Res4) до росту в умовах *in vitro* та *in planta*. Ізолят Res2 накопичувався в середовищі та в рослині в рази повільніше, ніж стандартна чутлива культура *Pst*, а ізолят Res4 за збереження нормального росту в умовах *in vitro* демонстрував суттєво нижчі рівні інфекційності в рослині. Набуття стійкості до фагів цими ізолятами спровокувала зміни в бік зниження патогенності, деталі яких дозволить розкрити лише повногеномний аналіз резистентних штамів.

Вищевикладені тези мають як теоретичне, так і практичне значення: виділені специфічні бактеріофаги після повної характеристики можуть бути

використані в якості складових фагових препаратів за умови дотримання всіх рекомендованих правил обробки; підібрану методику інокуляції рослин фагами в лабораторних умовах можна використовувати для демонстрації ефективності вірусів і тестування їх протимікробної активності, а результати можуть бути обчислені статистично і принадні до порівняння. Результати проведеного дослідження з імунної відповіді рослин на сумісне навантаження вірусом і бактерією є важливим етапом у фундаментальному розумінні процесів взаємодії фага та рослинного організму і необхідні для подальшого успішного використання фагів як терапевтичних агентів. Аналіз змін патогенності та здатності до росту бактерій внаслідок набуття резистентності до фагів є необхідним в контексті фаготерапії та дослідження впливу фагів на рослину.

**Ключові слова:** вірус, бактеріофаги, фітопатогенні бактерії, фітобактеріози, *Pantoea agglomerans*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas syringae*, філогенетичний аналіз, секвенування, антибактеріальна активність, патоген, електронна мікроскопія.

## SUMMARY

Korniienko N.O. **Bacterial viruses of the families *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae* as potential components of antimicrobial drugs** – Qualification scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy (Candidate of Biological Sciences) in the specialty 091 "Biology" (09 - Biology) – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine – Kyiv, 2023.

The dissertation is devoted to the study of lytic properties of specific bacterial viruses (bacteriophages) from families *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae*. Selection and characterization of bacteriophages specific to common pathogens of bacteriosis, their biological and genetic properties were studied, the scheme of interaction of phages with bacteria *in planta* was developed and the influence of phages on the primary link of plant immune response was investigated.

The urgency of the topic of qualification work is due to the need to find and study new lytic bacteriophages specific to phytopathogenic bacteria - representatives of the families *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae*, which are widespread pathogens of phytobacteriosis in Ukraine. Antimicrobial activity of phages is well studied *in vitro*, but there is a large gap in *in planta* studies, both in Ukraine and worldwide. The variety of methods of bacteriophage efficacy research against their hosts *in planta* is also problematic as the results of experiments cannot be compared. The effect of co-inoculation of bacteriophage and bacteria on the immune response of plants is poorly investigated.

The search for bacteriophages specific to bacteriosis pathogens that cause diseases of important plant crops for agriculture is an urgent task for Ukraine, the agricultural sector of which is still important for the economy of both our country and Europe. According to EU standards and requirements for the purity of crop

products from chemically and biologically active substances against plant pathogens, antibiotics are not recommended, so the search for alternative approach to fight bacteriosis is an important task for scientists. One of the most effective and promising methods is the use of lytic, pathogen-specific bacteriophages (phages).

At the moment, different approaches and methods have been used to model the potential of phages in laboratory conditions and field tests. As of today, the standard protocol for evaluating the effectiveness of therapeutic action of phages has not yet been adopted. Some studies rely on visual assessment of symptoms, others focus on plant biomass, and very rarely researches calculate the amount of bacteria and/or phages in tissues. An additional problem of practical use of phage therapy is the lack of knowledge about possible interactions between phages and plants. It is believed that phages do not interact directly with plants, but there have been already identified a number of phage-like genes.

The task of our study was to isolate and characterize lytic bacteriophages specific to *Pantoea agglomerans*, *Serratia marcescens* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, to characterize them, test their ability to suppress phyto-bacteriosis in laboratory conditions, and to investigate their effects on the immune condition of plants. The study of these issues is important for the successful use of phages in the therapy and prevention of phyto-bacteriosis not only in Ukraine but also in other countries, and should shed light on the relationship between phage and plants.

Classical virological, microbiological, molecular genetic and methods from the field of plant physiology were used, namely: determination of antibiotic resistance of bacteria by disc-diffusion method, biochemical characterization of bacteria using selective media and biochemical test-sets, isolation of bacteriophages by enrichment method, differential centrifugation, testing of activity of phages by double agar layers and spot test, determination of phage stability to action of inactivating agents (temperature, pH), inoculation of *Arabidopsis thaliana* by methods of flood-inoculation, infiltration, inoculation in liquid medium, electron

microscopy, spectrophotometry, GUS-staining, sequencing of bacteriophages by Ion Torrent method, statistics.

During the dissertation research, bacteriophages specific to *P. agglomerans* (pre-isolated from pepper plants with symptoms of bacteriosis and determined by biochemical tests), *S. marcescens* and *P. syringae* pv. *tomato* DC 3000 (*Pst*) (both cultures were taken from laboratory collections) have been isolated for the first time in Ukraine. All bacteriophages have been purified and accumulated, morphologically characterized using an electron microscope. According to morphological characteristics phage isolate Eh1, specific to *P. agglomerans*, and a phage 4S specific to *S. marcescens*, belongs to the family *Myoviridae*, order *Caudovirales*; isolates of Eir4 and *Pst*-specific bacteriophage Eisa9 have a typical morphology of podoviruses and, according to preliminary genetic analysis, belongs to the family *Autographiviridae*. The phage genome 4S completely sequenced and loaded into the world genetic bank GenBank NCBI (accession number MW082584). Results of comparison with nucleotide sequences of other phages specific to *S. marcescens* have shown that the most related to *Serratia* phage 4S phage is *Serratia* phage CBH8. The results of a phylogenetic analysis of the MCP (main capsid protein) of *Serratia* phage 4S showed that its MCP sequence was most homologous to the MCP phage sequences of *Acinetobacter* and *Enterobacter*. A phylogenetic analysis of the *Serratia* phage 4S DNA helicase sequence has shown that it is most homologous to the *Yersinia* and *Enterobacter* phage DNA helicase sequences. Bacteriophages Eir4 and Eisa9 specific to *Pst* have been tested for stability in different temperatures and pH. The phages remained stable at temperatures between 4°C (incubation temperature) and 26°C (growth temperature for *Pst*) and pH 7-9. The dynamics of Eir4 and Eisa9 interaction with *Pst* has been studied on the spectrophotometer and it has been found that the phage Eir4 has greater lytic activity, as it has completely lysed the bacterium in the environment after 80 minutes of co-incubation, and Eisa9 lysed it after 125 minutes, while maintaining the

concentration of bacteria at a stable level, indicating specific and different from ordinary lytic phages relationship with the host.

The studied bacteriophages have been tested for the ability to limit the growth of bacteria in plant tissues. The ability of isolate Eh1 to inhibit the development of phytobacteriosis caused by *P.agglomerans* was tested using the method of potato discs, and in the case of *Serratia* phage 4S - by inoculation of onion scales. Evaluation of effectiveness was carried out visually by the presence of symptoms. The bacteriophages we isolated demonstrated efficacy against *P.agglomerans* and *S. marcescens* in preventing bacterial infection, since there were no symptoms typical for these pathogens on inoculated plant samples. This indicates their potential as components of the phage drug, and the presence of a full-genomic sequencing of *Serratia* phage 4S makes this virus a full-fledged candidate for such drugs, as this is a prerequisite for the use of viruses in therapy.

To study the mechanisms of interaction between plants, pathogenic bacteria and phages, the model system *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*)-*A.thaliana*-bacteriophages was used. The bacteria and the plant in this system are equally perfectly studied organisms, so we took this opportunity and for the first time reproduced all the standard methods of inoculation of *A.thaliana* to check the effect of co-infection of bacteriophage and bacteria on the plant organism. The first method was a flood-inoculation, in which two-week *Arabidopsis* plants, grown on Petri dishes with a semi-hard environment Murashige & Skoog (MS), were treated with bacteria and a mixture of bacteria and phage. The phage Eir4 did not lyse all bacterial cells, but significantly reduced the concentration of bacteria in the samples. In a three-day experiment on this method, phage Eir4 showed high efficiency in inhibiting the development of phytobacteriosis on the first and second day after inoculation. The concentration of *Pst* in plants infected with a mixture of Eisa9 was indistinguishable from plants infected only by *Pst*. We linked these results to the consequences of the specific relationships of this phage with the bacteria that were

observed in the study of their dynamics in previous experiments. Although this phage cannot be currently recommended as a candidate for the components of phage drugs, it is quite interesting genetically and biologically.

According to the results of inoculation of *Arabidopsis* plants by infiltration, both phages proved ineffective in inhibiting *Pst* growth because its concentration remained high - on the same level as bacterial control in all plant groups, including those inoculated with phages. Limiting factors in the internal environment of the plant affected the ability of the phages to infect bacteria, although the viruses were isolated from the inoculated leaves even 4 days after inoculation. Therefore, we cannot recommend this method to evaluate the effectiveness of the phage *in planta* due to the limited ability of viruses to infect bacterial cells inside the plant body.

According to the results of inoculation of ten-day arabidopsis plants in a liquid MS medium (in 24-well plates), the phage Eir4 successfully limited the growth of *Pst* both in groups treated with a mixture of phage and bacteria and in groups where the phage was added one day before *Pst* inoculation. The method of inoculation in a liquid medium has proved to be the most effective for the initial study of the effectiveness of phages in inhibiting the growth of bacteria, fast compared to other methods we have worked out (the time of the experiment is up to 12 days) and can be recommended as a universal technique. The effect of co-infection of phage and *Pst* on the immune response of *A.thaliana* was demonstrated for the first time by using the GUS-staining method of arabidopsis PR1::GUS and FRK1::GUS mutant leaves inoculated with bacteria and phage mixture by infiltration. It has been shown that the phage does not induce expression of the genes of the early immune response *PR1* and *FRK1*, and a mixture of phage and bacteria could produce a stronger response due to bacterial lysis or leaf damage during infiltration. When inoculated in a liquid medium, the synthesis of PR1 in plants treated with a mixture of phage and bacteria was significantly less intense than in bacterial control, and in plants

treated only with phage the intensity of coloring statistically did not differ from that in plants inoculated with 10 mM MgCl<sub>2</sub> buffer (control).

We isolated phage resistant isolates of *Pst*. The change in the ability of four isolates (Res1, Res2, Res3, Res4) to grow *in vitro* and *in planta* was investigated. Isolate Res2 accumulated in the environment and in the plant at times slower than normal sensitive *Pst* culture, and isolate Res4, while maintaining normal growth *in vitro*, showed significantly lower levels of infectiousness inside plant. The acquisition of resistance to phages with these isolates provoked changes in the direction of reducing pathogenicity, the details of which will be only revealed by the full genomic analysis of resistant strains.

The above theses are both theoretical and practical: specific bacteriophages are isolated with the full characteristics provided and can be used as components of phage preparations, subject to all recommended processing rules; selected method of plant inoculation phages in the laboratory can be used to demonstrate the effectiveness of viruses and to test their antimicrobial activity, and the results can be calculated statistically. The results of the study on the immune response of plants to co-inoculation are an important step in the fundamental understanding of the processes of phage and plant organism interaction and are necessary for the further successful use of phages as therapeutic agents. Analysis of changes in pathogenicity and ability to grow bacteria due to acquisition of resistance to phages is necessary in the context of phage therapy and study of the impact of co-inoculation on the plant.

Keywords: virus, bacteriophages, phytopathogenic bacteria, phytobacteriosis, *Pantoea agglomerans*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas syringae*, phylogenetic analysis, sequencing, antibacterial activity, pathogen, electron microscopy.

## Список публікацій здобувача

### Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

- 1) Korniienko N., Dukhno E., Kharina A., Budzanivska I. Isolation of bacteriophages with lytic activity against a newly identified *Pantoea agglomerans*. Вісник Київського університету ім. Тараса Шевченка. Біологія. 2019. 77:50-54. DOI:10.17721/1728\_2748.2019.77.50-55 (*Дисертантом проведено відбір зразків, експериментальна частина роботи, аналіз та обговорення результатів, написання статті*).
- 2) E. O. Dukhno, N. O. Kornienko, S. R. Shybanov, I. G. Budzanivska, A. V. Kharina. Complete genome sequence of Serratia phage 4S isolated from wastewater in Ukraine. Biopolymers and cell. 2021. 37(4):315-322. DOI:10.7124/bc.000A5D (*Дисертантом проведено відбір зразків, експериментальна частина роботи*) (Scopus, Web of Science)
- 3) Korniienko N., Kharina A., Budzanivska I., Burketová L., Kalachova T. Phages of phytopathogenic bacteria: high potential but challenging application. Plant Protection Science. 2022. 58(2):81-91. DOI: 10.17221/147/2021-PPS (*Дисертантом проведено аналіз літературних даних, написання статті*) (Scopus, Web of Science)
- 4) Korniienko, N.; Kharina, A.; Zreløvs, N.; Jindřichová, B.; Moravec, T.; Budzanivska, I.; Burketová, L.; Kalachova, T. Isolation and Characterization of Two Lytic Phages Efficient Against Phytopathogenic Bacteria From Pseudomonas and Xanthomonas Genera. Frontiers in Microbiology. 2022. 13:853593. DOI:10.3389/fmicb.2022.853593 (*Дисертантом проведено відбір зразків, експериментальна частина роботи, аналіз та обговорення результатів, написання статті*). (Scopus, Web of Science)

### Опубліковані праці апробаційного характеру:

- 5) Korniienko N., Dukhno E., Kharina A., Budzanivska I. Isolation of phages specific to *Pantoea agglomerans* and detection of their activity on pepper plants. EMBO workshop «Viruses of microbes». Wrocław, Poland, 2018, 09-13 of July. 180 p. (Особистий внесок здобувача – проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка тез)
- 6) Kornienko N., Dukhno E., Kharina A., Budzanivska I. Detection of *Serratia marcescens* bacteriophages in wastewaters. Czechoslovak Virology conference. Bratislava, Slovakia, 2019, 13-15 of February. 82 p. (Особистий внесок здобувача – проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка тез)
- 7) Kornienko N., Kalachova T., Kharina A., Budzanivska I. Characterization of newly isolated phages specific to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. IX International Conference “Bioresources and viruses”. Kyiv, Ukraine, 2019; 9-11 of September. 35 p. (Особистий внесок здобувача – проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка тез)
- 8) Korniienko N., Kharina A., Burketova L., Kalachova T. Characterization of newly isolated phages of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and their interactions with plant host *Arabidopsis thaliana*. 11th Scandinavian Plant Physiology Society PhD Student Conference. Turku, Finland, 2020, 2-4 of September. 46 p. (Особистий внесок здобувача – проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка тез)
- 9) Korniienko N., Kharina A., Burketova L., Kalachova T. The impact of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and newly isolated specific phages co-infection on plant host *Arabidopsis thaliana*. FEMS Online Conference on Microbiology. Belgrad, Serbia, 2020, 28-31 of October. 440 p. (Особистий внесок здобувача – проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка тез)

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	20
ВСТУП.....	21
РОЗДІЛ 1. БАКТЕРІОФАГИ І ФІТОПАТОГЕННІ БАКТЕРІЇ.....	27
1.1. Загальні відомості про бактеріофаги.....	27
1.1.1. Бактеріофаги <i>Pseudomonas syringae</i> .....	31
1.1.2. Бактеріофаги <i>Serratia</i> .....	31
1.1.3. Бактеріофаги <i>Pantoea</i> .....	32
1.2. Фітопатогенні бактерії.....	33
1.2.1. Характеристика роду <i>Pseudomonas</i> .....	35
1.2.2. Характеристика роду <i>Serratia</i> .....	38
1.2.3. Характеристика роду <i>Pantoea</i> .....	39
1.3. Характеристика фітобактеріозів.....	40
1.4. Методи боротьби з фітобактеріозами.....	42
1.4.1. Хімічні методи боротьби.....	42
1.4.2. Біологічні методи боротьби.....	45
РОЗДІЛ 2. ФАГОТЕРАПІЯ.....	47
2.1. Використання препаратів на основі бактеріофагів.....	47
2.2. Переваги та недоліки препаратів бактеріофагів.....	48
2.3. Сучасні проблеми фаготерапії.....	49
РОЗДІЛ 3. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	57
3.1. Джерела бактерій та бактеріофагів.....	57
3.2. Рослинний матеріал для експериментів з <i>P.syringae pv. tomato</i> DC3000.....	57
3.3. Виділення та ідентифікація <i>Pantoea agglomerans</i> .....	58
3.4. Виділення бактеріофагів <i>P.agglomerans</i> та <i>S.marcescens</i> .....	59
3.5. Виділення бактеріофагів <i>P.syringae pv. tomato</i> DC3000.....	60

3.6. Очищення та накопичення бактеріофагів <i>P.agglomerans</i> та <i>S.marcescens</i> .....	61
3.7. Очищення та накопичення бактеріофагів <i>P.syringae pv. tomato</i> DC3000.....	61
3.8. Електронна мікроскопія.....	62
3.9. Дослідження біологічних властивостей фагів.....	62
3.10. Методи інокуляції рослин.....	65
3.10.1. Метод картопляних дисків.....	65
3.10.2. Метод інокуляції лусок цибулі.....	65
3.10.3. Флад-інокуляція.....	65
3.10.4. Інокуляція в рідкому середовищі.....	66
3.10.5. Інфільтрація.....	66
3.10.6. GUS-гістохімічний аналіз.....	67
3.11. Робота з фагорезистентними штамми.....	67
3.12. Підготовка бактеріофагів до секвенування методом Ion Torrent.....	68
3.13. Підготовка бібліотеки зразків.....	69
3.14. Секвенування бактеріофагів <i>S.marcescens</i> .....	71
3.15. Обробка отриманих даних.....	72
РОЗДІЛ 4. ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІЙ <i>PANTOEA AGGLOMERANS</i> , <i>SERRATIA MARCESCENS</i> ТА <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. TOMATO</i> ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХ БАКТЕРІОФАГІВ.....	74
4.1. Ідентифікація збудника фітобактеріозу цибулі.....	74
4.2. Характеристика бактеріофага <i>P.agglomerans</i> .....	83
4.3. Характеристика бактеріофагів <i>S.marcescens</i> .....	85
4.4. Характеристика бактеріофагів <i>Pst</i> DC3000.....	92
РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ СУМІСНОЇ ІНОКУЛЯЦІЇ БАКТЕРІЄЮ ТА БАКТЕРІОФАГАМИ НА РОСЛИННИЙ ОРГАНІЗМ.....	93
5.1. Флад-інокуляція.....	93
5.2. Інфільтрація.....	97

5.3. Інокуляція <i>A.thaliana</i> в рідкому MS середовищі.....	100
5.4. Метод фарбування GUS та дослідження імунної відповіді рослин.....	102
РОЗДІЛ 6. ФАГОРЕЗИСТЕНТНІ ШТАМИ <i>PST</i> DC 3000.....	107
6.1. Ріст резистентних ізолятів <i>in vitro</i> .....	107
6.2. Ріст резистентних ізолятів <i>in planta</i> .....	108
6.3. Інфільтрація стійкими ізолятами мутантів nahG.....	109
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	111
ВИСНОВКИ.....	117
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ДЖЕРЕЛ.....	119
ДОДАТКИ.....	144

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- БУО – бляшкоутворююча одиниця
- КУО – колонієутворююча одиниця
- LB – середовище Лурія-Бертані
- Pst* – *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*
- Ath* – *Arabidopsis thaliana*
- MS – середовище Мурашіге-Скуга
- WT – wild type – дикий тип (Col-0) рослини *Arabidopsis thaliana*
- MOI – multiplicity of infection, множинність інфекції
- PR1* – Pathogenesis-related protein 1
- FRK1* – FLG22-induced receptor-like kinase 1
- BLASTn – Nucleotide-nucleotide basic local alignment search tool - алгоритм та програма для порівняння інформації про послідовності нуклеотидів

## ВСТУП

### Обґрунтування вибору теми дослідження

Фітопатогенні бактерії завдають значної шкоди рослинництву. Вони асоційовані з культурними і дикорослими видами рослин, спричинюють значні втрати у рослинництві, лісівництві, квітникарстві, суттєво знижують урожайність та якість продукції незалежно від регіону їх поширення (3). В 80-х роках ХХ століття почала збільшуватись кількість видів фітопатогенних бактерій на полях України. Збудники бактеріальної гнилі *Pectobacterium carotovorum* та судинного бактеріозу капусти *Xanthomonas campestris* викликали небачені епіфітотії, що знищили весь урожай капусти і привели до необхідності імпорту цієї культури. Значних збитків завдають бактеріози під час вегетації або зберігання картоплі, моркви та буряків. Водночас класичні методи захисту сільськогосподарських угідь стають неефективними. Пошук бактеріофагів, специфічних до збудників бактеріозів, які викликають хвороби важливих для сільського господарства культур рослин – актуальне завдання для України, яка є аграрною державою. Згідно з нормами ЄС і вимогами до чистоти продуктів рослинництва від хімічно- та біологічно-активних речовин проти збудників фітобактеріозів рослин не рекомендовано використовувати антибіотики, тому пошук альтернативних засобів боротьби із бактеріозами є важливим завданням науки і біотехнології. Відомі підходи у межах використання біологічних засобів боротьби із збудниками фітобактеріозів передбачають використання антагоністичної мікрофлори, сівозміну, використання різноманітних рослинних витяжок, бактеріальних ліпідів, проте одним із найбільш ефективних і багатообіцяючих засобів боротьби із фітопатогенними мікроорганізмами є літичні, специфічні до збудника бактеріофаги (4). Після тривалої коєволюції із мікроорганізмами-хазяями,

бактеріофаги виробили механізми уникнення захисних систем бактерій, таких як рестрикційно-модифікаційні системи, модифікаційно-залежні системи (5).

Дослідження фагів націлені на найбільш поширені і шкодочинні збудники рослин. В останні роки фаги були ізольовані із бактеріальних зразків, що уражають більшість культур, особливо тих, що викликають великі втрати врожаю картоплі, капусти та моркви (6–8). Незважаючи на активні дослідження щодо використання фагових продуктів проти бактеріозів рослин, практичне застосування таких знань все ще обмежене. Однією з причин такого обмеження є неоднорідність стратегій досліджень і відсутність загальноприйнятих протоколів для оцінки ефективності фагів у рослин. Крім того, більш глибоке дослідження впливу фагових суспензій і продуктів їх взаємодії з бактеріями на рослини, особливо на вроджену імунну систему рослин, необхідне для відкриття нових напрямків у лікуванні і профілактиці захворювань рослин.

На даний момент вплив фагів на імунітет рослин та фізіологію майже не вивчений. Загальноприйнято, що фаги не взаємодіють безпосередньо з рослинами, тому вплив фагів на них лишається непоміченим. Однак у рослин виявлено ряд фагоподібних генів (9), що, ймовірно, є наслідком горизонтальної передачі бактеріями. Дослідження викладених проблем є фундаментально важливим для розуміння процесів взаємодії між фагами, бактеріями та рослинами, що є необхідним етапом у розвитку фаготерапії.

Отже, пошук нових літичних бактеріофагів, специфічних до збудників фітобактеріозів в Україні, дослідження їх біологічних властивостей і вплив на рослинний організм є важливим для фундаментальної та прикладної науки.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, темами**

Дисертаційна робота виконана у межах науково-дослідницьких тем кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка: № 21БФ036-02

«Вірусологічний менеджмент небезпечних захворювань рослин як складова біобезпеки України» (№ держреєстрації 0121U109863) та теми кафедри вірусології № 16КФ036-05 «Структура та функції вірусів при різних екологічних станах».

**Мета та завдання дослідження.**

Метою дисертаційної роботи є характеристика бактеріофагів фітопатогенних бактерій *Pantoea agglomerans*, *Serratia marcescens* та *Pseudomonas syringae*, дослідження прямого та опосередкованого впливу фагів на захисну реакцію рослини.

Відповідно до мети було виконано наступні **завдання**:

- Виділити бактеріофаги, специфічні до *Pantoea agglomerans*, *Serratia marcescens* та *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*;
- Дослідити біологічні та генетичні властивості виділених бактеріофагів та їх здатність пригнічувати ріст патогенних мікроорганізмів *in vitro* та *in planta*;
- Розробити оптимальну схему для оцінки антибактеріальної активності фагів у потрійній системі рослина-фаг-бактерія;
- Дослідити прямий та опосередкований вплив фага на розвиток захисної відповіді рослини;
- Дослідити можливість утворення резистентності у бактерій до бактеріофагів.

*Об'єкт дослідження*: літичні бактеріофаги, фітопатогенні бактерії, результати їх взаємодії, що можуть бути використані для створення фаготерапевтичних препаратів.

*Предмет дослідження*: антимікробний потенціал бактеріофагів та їх вплив на захисні реакції рослин.

**Методи дослідження**: візуальна діагностика, встановлення антибіотикорезистентності бактерій диско-дифузійним методом, видове визначення за допомогою селективних середовищ та біохімічних тестів,

виділення бактеріофагів методом збагачення, диференційне центрифугування, метод подвійних агарових шарів, спот-тест, визначення стійкості фагів до дії інактивуючих агентів (температури, рН), рослини-індикатори (метод інокуляції картопляних дисків та цибулиних лусок, інокуляція *Arabidopsis thaliana* методами флад-інокуляції, інфільтрації, інокуляції в рідкому середовищі), спектрофотометрія, секвенування бактеріофагів методом Ion Torrent, статистичні методи.

### **Наукова новизна одержаних результатів.**

Виділено і охарактеризовано нові ізоляти бактеріофагів, які можуть бути використані для розробки фагових препаратів, проаналізовано та додано в базу даних NCBI геном бактеріофага *S. marcescens* 4S.

Вперше показана ефективність нововиділених ізолятів фагів у попередженні розвитку фітобактеріозу, викликаних *P. syringae* pv. *tomato*, *S. marcescens*, *P. agglomerans*.

Вперше підібрано оптимальну схему для оцінки антибактеріальної активності фагів у потрійній системі рослина-фаг-бактерія.

Вперше продемонстрована відсутність прямого впливу бактеріофагів на активацію імунної відповіді рослин та збільшення інтенсивності цієї відповіді за умови сумісної інокуляції з бактерією і наявності продуктів лізису та бактеріальних решток в лізаті, а також збільшення концентрації фагів.

Отримано стійкі до бактеріофагів штами *Pst* DC 3000 і описано зміни в їх здатності до росту після набуття фагорезистентності.

### **Практичне значення одержаних результатів.**

Виділені бактеріофаги є потенційними кандидатами як складові фагових препаратів для профілактики та/або лікування фітобактеріозів, викликаних *P. syringae* pv. *tomato*, *S. marcescens*, *P. agglomerans*. Наявність повногеномного сиквенсу фага 4S дає змогу проводити польові дослідження і ставити питання про включення його до фагових коктейлів. Даний сиквенс знаходиться у базі

даних GenBank, доданий від імені Київського національного університету ім. Тараса Шевченка.

Проведений аналіз методик інокуляції рослини арабідопсиса фагами дозволив віднайти найоптимальніший протокол для постановок подібних експериментів (метод інокуляції проростків в рідкому середовищі) для первинної оцінки активності вірусів і тестування їх інфекційності, а результати їх можуть бути обчислені статистично і припадні до порівняння.

Результати проведеного дослідження з імунної відповіді рослин на сумісне навантаження фагом і бактерією є важливим етапом у фундаментальному розумінні процесів взаємодії фага та рослинного організму і необхідні для подальшого успішного використання фагів як терапевтичних агентів. Аналіз змін патогенності та здатності до росту бактерій внаслідок набуття резистентності до фагів є необхідним в контексті фаготерапії та дослідження впливу сумісного навантаження на рослину.

### **Особистий внесок здобувача**

Дисертаційна робота є самостійним та оригінальним науковим дослідженням, виконаним на базі кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка та лабораторії патофізіології рослин Інституту експериментальної ботаніки Академії наук Чеської Республіки. Постановка задач, опрацювання світової та вітчизняної літератури, розробка експериментальних схем дослідження та отримання експериментальних даних, аналіз та узагальнення результатів, їх статистична обробка, формулювання висновків дисертації зроблені автором особисто під керівництвом д.б.н., професора І.Г. Будзанівської та к.б.н. Калачової Т.А.

### **Апробація результатів дисертації.**

Основні результати досліджень дисертаційної роботи були представлені на таких вітчизняних та міжнародних конференціях:

- EMBO workshop «Viruses of microbes». Wrocław, Poland, 2018, 09-13 of July.
- Czechoslovak Virology conference. Bratislava, Slovakia, 2019, 13-15 of February.
- IX International Conference “Bioresources and viruses”. Kyiv, Ukraine, 2019, 9-11 of September.
- 11th Scandinavian Plant Physiology Society PhD Student Conference. Turku, Finland, 2020, 2-4 of September.
- FEMS Online Conference on Microbiology. Belgrad, Serbia, 2020, 28-31 of October.

### **Публікації**

За результатами наукових досліджень опубліковано 11 наукових праць, серед яких 1 стаття у фаховому періодичному виданні, затверженому МОН України, 3 статті у журналах, що входять до міжнародних наукометричних баз SCOPUS та WoS, та 7 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конференцій.

### **Структура та об’єм дисертації**

Дисертаційна робота викладена на 145 сторінках машинопису і містить традиційні розділи: Вступ, Огляд літератури (2 розділи), Матеріали та методи досліджень, Результати та обговорення (3 розділи), Узагальнення результатів, Висновки, Список використаних джерел (192 посилання) та Додатки. Ілюстративний матеріал включає 29 рисунків та 5 таблиць.

# РОЗДІЛ 1

## БАКТЕРІОФАГИ І ФІТОПАТОГЕННІ БАКТЕРІЇ

### 1.1. Загальні відомості про бактеріофаги

Бактеріофаги були відкриті на початку двадцятого століття Туортом в 1915 році і д'Ерелем в 1917 році (10), які незалежно один від одного повідомили про фільтруючих і трансмісивних біологічних агентів, здатних лізувати бактерії. Однак вони не могли дійти згоди щодо походження цього «літичного принципу». Туорт писав, що ймовірно бактеріальний фермент зі здатністю до росту викликав лізис, а д'Ерель припустив, що за це явище відповідає вірус. Хоча теорія «бактеріального вірусу» д'Ереля не була доведена остаточно протягом наступних тридцяти років, ідея використання фагів як агентів біоконтролю бактеріальних захворювань була прямим наслідком його концепції. У медичній сфері спалахнув значний ентузіазм щодо можливого використання фагів як інструментів боротьби з бактеріальними захворюваннями, оскільки на той час не було варіантів контролю їх розвитку. Через чотири роки після відкриття, зробленого д'Ерелем, Бруно та Мейсін (11) доповіли про можливість контролю *Bacillus anthracis* і стафілококових інфекцій, використовуючи бактеріофаги в якості ліків; через рік були випробувано фаги для контролю черевного тифу і бацилярної дизентерії (12). Фаги також широко використовувалися для контролю спалахів холери в Індії (13). Протягом наступних сорока років було опубліковано понад 800 статей про терапевтичні можливості бактеріофагів. Через кілька років після відкриття д'Ереля фаги були запропоновані як засоби контролю захворювань рослин (14), і було винесено питання щодо їх можливого використання задля терапії фітобактеріозів. У 1924 році Мальман та Хемстріт (15) виділили *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* з капусти із симптомами фітобактеріозу і зазначили, що фільтрат рідини, зібраної з гнилої капусти, гальмує ріст збудника *in vitro*. Наступного року Кунс і Котіла (16)

інокулювали морквяні диски бактерією *Erwinia carotovora subsp. carotovora* разом з фагом і окремо. Гниття спостерігали тільки там, де бактерії були інокульовані без додавання фага. Вони вважали, що в результаті широкої присутності цього «літичного принципу» (фагів) бактеріофаг може відігравати важливу роль в обмеженні бактеріальних організмів в природньому ґрунті. Котіла і Кунс (17) також виділили бактеріофаги із зразків ґрунту, активних проти збудника чорної ніжки картоплі для контролю або профілактики захворювань за допомогою фагів. Вони продемонстрували в експериментах з камерою росту, що ко-інокуляція *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* разом з фагом успішно гальмувала ріст збудника і запобігала гниттю бульб. У 1934 році Мессі (18) припустив, що фаг є основним фактором обмеження тяжкості перебігу бактеріального фітофторозу на полях бавовни. Кількість бактеріальних захворювань зменшилася на полях, затоплених річкою Ніл. Мессі приписав це зменшення лізису *Xanthomonas malvacearum* за допомогою фага, що переноситься у воді Нілу. Роком раніше він отримав фаг для *X. malvacearum* із затопленого ґрунту. Томас (17) в свій час повідомляв про ефективний контроль хвороби кукурудзи Стюарта. Він обробляв насіння кукурудзи, інфіковане *Pantoea stewartii* - збудником в'янення кукурудзи Стюарта, - фагом, ізольованим з хворих рослин. Обробка насіння знизила захворюваність з 18% до 1.4%. Не зважаючи на перспективні результати перших досліджень, фаготерапія не виявилася надійним і ефективним засобом боротьби з фітобактеріями. Дослідники сумнівалися, чи можливі ще позитивні результати. У 1963 році Окабе заявив, що «загалом фаг, здається, неефективний для [контролю] розвитку хвороби» (19). Через три десятиліття Гото зробив висновок, що «практичне використання фагів для боротьби з бактеріальними хворобами рослин у цій галузі не стало успішним» (20). Крім того, враховуючи вузький спектр активності фагів і широку спектральну активність антибіотиків, у медичній сфері було поширене переконання, що фаги ніколи не будуть такими ж ефективними, тому що для успішного

лікування необхідно точно визначити збудник (4). Інтерес до фагів зменшився через це обмеження, а також через появу різноманітних ефективних антибіотиків. Хімічний контроль з антибіотиками і мідними сполуками надовго став стандартом для боротьби з бактеріальними хворобами рослин (21).

Бактеріофаги - це віруси, які інфікують бактерії і потребують клітинні механізми для їх реплікації, а тому вважаються облігатними внутрішньоклітинними паразитами (22,23). Вони є найбільш різноманітними і поширеними біологічними об'єктами на Землі (кількість оцінено у більше ніж  $10^{30}$  віріонів) (24). Ці віруси відповідають за безперервне регулювання мікробної екології і діють на широкий спектр екосистем (25). Бактеріофаги неоднорідні за своїми структурними, фізико-хімічними та біологічними властивостями; припускають, що вони мають поліфілетичне походження (4). До 2022 року за даними Міжнародного комітету з таксономії вірусів (ICTV), бактеріофаги були класифіковані на основі морфологічного типу та нуклеїнової кислоти (дволанцюгова ДНК, одноланцюгової ДНК, дволанцюгової РНК та одноланцюгової РНК), проте наразі класифікація фагів зазнала значних змін. Більшість бактеріофагів тепер належать до порядку *Caudoviricetes*, який поділяється на щонайменше 19 родин (26), мають хвостові відростки різної довжини та ікосаедричні головки, що містять дЛДНК (27). Загалом хвостаті фаги можна поділити на три морфологічні групи: міоподібні фаги (за попередньої назвою родини *Myoviridae*, з короткими скоротливими хвостами), сіфоподібні фаги (за попередньої назвою родини *Siphoviridae*, з довгими, гнучкими, нескоротливими хвостами) і подофаги (за попередньої назвою родини *Podoviridae*, з дуже короткими нескоротливими хвостами). Головка або капсид складається з білкового шару, що виконує функцію захисту генетичного вмісту, тоді як хвіст містить структури, які чітко розпізнають поверхнево-специфічні рецептори сприйнятливих бактерій.

Бактеріофаги є дуже специфічними вірусами, тому що вони атакують один вид або, в деяких випадках, один штам бактерії. Однак є фаги, які можуть інфікувати широкий спектр організмів-господарів, включаючи різні види в межах роду або навіть членів інших родів, що належать до однієї родини (28). Інфекція починається з адсорбції фага на поверхні бактеріальної клітини за допомогою структури хвоста фага і взаємодією її з рецептором хазяїна, а потім відбувається ін'єкція вірусного генетичного матеріалу в цитоплазму (27). З цього моменту цей процес може йти двома шляхами: літичним або лізогенним циклами. У літичному циклі вірусна ДНК бере на себе більшу частину метаболізму хазяїна і індукує молекулярні механізми для створення нових фагів, що призводить до лізису клітини і вивільнення сотень нових вірусів. Цей процес може повторюватись до тих пір, поки бактеріальний хазяїн присутній в адекватній кількості і нормальних фізіологічних умовах для підтримки реплікації (29). Під час лізогенного циклу вірусний генетичний матеріал інтегрується в бактеріальну хромосому (у вигляді профагу) і залишається в прихованому стані, реплікуючись в дочірні клітини протягом багатьох поколінь (30). Це може призвести до зміни фенотипу хазяїна і, в деяких випадках, підвищити бактеріальну патогенність (31). Деякі фактори вірулентності часто кодується бактеріофагами, які можуть бути передані господарю шляхом процесу, відомого як трансдукція (32,33). Крім того, деякі бактеріофаги можуть інтегруватись в ДНК хазяїна, зв'язуючись з його геномом під час реплікації і передачі їх бактеріальним популяціям. Сплячі профаги можуть переключитись на літичний цикл за допомогою специфічних подразників, наприклад, пошкодження бактеріальної ДНК (22). Повідомлялося і про інші цикли фагів, такі як псевдолізогенний цикл і хронічна інфекція. У псевдолізогенному циклі вірусна нуклеїнова кислота може залишатися в клітині хазяїна в сплячому стані протягом декількох поколінь, перш ніж відбудеться лізис або руйнування клітин (34,35). Хронічна інфекція характеризується випуском вірусного потомства шляхом екструзії

або пропагування протягом декількох поколінь, не призводячи до втрати життєздатності господаря (34).

### **1.1.1. Бактеріофаги *Pseudomonas syringae***

Багато фагів, що інфікують *P. syringae*, були ізольовані і описані в останні роки. Для *P. syringae* pv. *syringae* високоефективний комерційно доступний фаг ф6 добре зарекомендував себе в *in vitro* експериментах (36). Нещодавно також доповіли, що цей фаг може лізувати *P. syringae* pv. *actinidae* (*Psa*) (37), запобігаючи розвитку пухлини ківі як *in vitro*, так і *in vivo*. Ще три літичні фаги (фХWY0013, фХWY0014 і фХWY0026), специфічні для цього збудника, були виділені з інфікованих ківі і класифіковані як представники родин *Siphoviridae*, *Myoviridae* і *Podoviridae* відповідно (за старою класифікацією) (38). Також було показано, що літичний фаг PPPL-1 ефективний у профілактиці і лікуванні ківі (39). П'ять нещодавно виділених літичних фагів *P. syringae* pv. *porri* були ефективними в лікуванні бактеріального фітофторозу в цибулі (40). На основі аналізу геномних послідовностей, більшість нових ізольованих фагів *P. syringae* мають морфологію подо- або міоподібних вірусів.

### **1.1.2. Бактеріофаги *Serratia***

На сьогоднішній день база даних NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) має щонайменше 64 геномних послідовностей фагів *Serratia*. Більшість фагів *Serratia*, перерахованих у GenBank NCBI-NIH, були ізольовані з таких середовищ, як стічні води, річкова вода, морська вода, ставкові води, м'ясо свиней, зразки фекалій та ґрунту, компост та супернатант нічних культур (2). Наприклад, два бактеріофаги *S. marcescens*, vB\_SmaA\_2050H1 і vB\_SmaM\_2050HW, були виділені з двох різних зразків відходів в Китаї (41);

в Японії три фаги (KSP20, KSP90 і KSP100) були ізольовані з річкових вод і були охарактеризовані морфологічно і генетично (42); фаг МТх також був виділений зі стічних вод (43). В Україні було виділено серію бактеріофагів із стічних вод, специфічних до фітопатогенних бактерій, в тому числі до *S. marcescens* (44).

### 1.1.3. Бактеріофаги *Pantoea*

На сьогоднішній день описано і охарактеризовано досить мало бактеріофагів, здатних заражати види *Pantoea*. LIMEzero і LIMELight були ізольовані і визначені, як специфічні до *Pantoea agglomerans*, і були визначені як представники роду *Phikmvirus* (PhiKMV-подібні віруси) в родині *Podoviridae*. Аналізуючи ці фаги, використовували селекцію штамів *Pantoea* та *Erwinia*, показавши, що LIMEzero здатний заражати лише штам *P. agglomerans*, з якого він був ізольований, у той час як LIMELight також інфікував ще й другий штам *P. agglomerans*, LMG 2660 (45). Не спостерігалось утворення бактеріальних колоній під час тестувань на штаммах *Erwinia amylovora* GBBC 403, *Erwinia mallotivora* LMG 1271 і *Pantoea stewartii* LMG 2717 і LMG 2719; однак, деякі фаги *Erwinia*, як повідомляється, можуть заражати штамми *Pantoea*. Фаги L1 і S2 (*Podoviridae*), ідентифіковані як фаги *E. amylovora*, здатні також заражати штамми *P. agglomerans* і *P. ananatis* (46). Фаги *E. amylovora* S10 і M7 (*Myoviridae*) інфікують тільки *P. ananatis* або *P. agglomerans*, відповідно, а фаг S7 (*Podoviridae*) демонструє ширший діапазон хазяїв, інфікуючи не тільки *E. amylovora*, але і *Erwinia billingiae*, *P. agglomerans*, *P. vagans* і *P. ananatis* (46).

## 1.2. Фітопатогенні бактерії

Фітопатогенні бактерії належать в основному до родин *Xanthomonadaceae*, *Pseudomonadaceae* та *Enterobacteriaceae*, і вони інфікують всі види рослин, які можуть забезпечити їх ріст та розмноження. Найбільш руйнівні збудники рослин належать до родів *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Acidovorax*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Streptomyces*, *Xylella*, *Spiroplasma*, та *Phytoplasma*. До фітопатогенних бактерій належать бактерії з клітинною стінкою, вони можуть бути грамнегативні або грампозитивні, а також без клітинної стінки (молікути). Загальна характеристика цих фітопатогенів полягає в тому, що більшість з них є неспороутворюючими, паличкоподібними організмами. Тільки види *Streptomyces* виробляють спори і є ниткоподібними. Більшість фітопатогенних бактерій невибагливі до харчування. Оптимальна температура їх зростання становить близько 23-28°C. Однак деякі з них, такі як *Ralstonia solanacearum* і *Burkholderia cepacia*, можуть рости при 42°C. Патогенні бактерії рослин можуть бути як строго аеробними, так і факультативно анаеробними. Фітопатогенні та фотосимбіотичні прокаріоти мають одну унікальну особливість: здатність розмножуватися в рослинах, що відрізняє їх від усіх інших прокаріотів. Вони можуть розмножитися до великої кількості клітин за короткий період часу в рослині-хазяїні. Жодна інша ознака не відрізняє їх від безлічі сапрофітів, які займають будь-яке інше середовище проживання, пов'язане з рослинами (47). Вони еволюціонували, щоб добре рости в своїх рослинах-хазяїнах, часто в конкретних видах, а також на певній частині рослини, наприклад, на квітках, листках, коріннях, бульбах або бульбоцибулинах. Усередині рослин-господарів фітопатогенні прокаріоти розмножуються у міжклітинному просторі, і проникнення в клітину зазвичай відбувається після руйнування та дезорганізації клітинних стінок. Генетичні дослідження показали участь багатьох генів у вірулентності та патогенезі. Ряд

патогенних бактерій рослин містить гени вірулентності та патогенності у плазміді (позахромосомний елемент), тоді як інші патогени несуть їх у своїх хромосомах. Збереження генів вірулентності та патогенності в локусах патогенності свідчить про взаємозамінне переміщення цих генів через межі видів шляхом горизонтального перенесення генів (48,49). Багато з цих генів забезпечують притаманну патогену здатність рости в своєму хазяїні і, отже, є важливими для успішної колонізації хазяїна. Фітопатогенні прокариоти викликають захворювання рослин на широкому спектрі рослин-господарів. Деякі з цих захворювань є дуже руйнівними і завдають серйозних економічних збитків. Фітобактерії розробляють нові стратегії виживання, щоб перешкодити зусиллям по боротьбі та ліквідації спричинених ними хвороб рослин. Кадо пише у своїй книзі (49), що придбання нових генів шляхом горизонтального перенесення є потужним засобом для розвитку патогена. Генерація нових і функціональних генів за допомогою селективних мутацій, продукти яких сприяють успішній колонізації, також може сприяти пристосованості патогенів. Незалежно від механізму, генетичні зміни, які є сприятливими для виживання патогена, відбуваються через тиск селекції, який чинять на бактерію різноманітні заходи боротьби, прийняті в сільськогосподарській практиці.

Фітопатогенні бактерії провокують захворювання в рослинах, проникаючи в тканини господаря (50). Фактори бактеріальної вірулентності знаходяться на поверхні бактерії або виділяються в навколишнє середовище. Білки, що виділяються бактеріями, транспортуються за допомогою молекулярних систем з бактеріальних клітин; непов'язані фактори вірулентності часто поділяють один і той же механізм секреції (51). Бактеріальна патогенність залежить від систем бактеріальної секреції (типу I-IV), відчуття кворуму (Quorum Sensing), рослинних ферментів, що деградують клітинні стінки, токсинів, гормонів, полісахаридів, протеїназ, сидерофорів,

меланіну. Всі ці системи і речовини, які необхідні для патогенної інфекції і вірулентності, виробляються бактеріями під час патогенно-рослинних взаємодій (52).

### 1.2.1. Характеристика роду *Pseudomonas*

Рід *Pseudomonas* належить до родини *Pseudomonadaceae*, родини грам-негативних *Gamma*proteobacteria, що включає роди *Cellvibrio*, *Mesophilobacter*, *Rhizobacter*, *Rugamonas* і *Serpens*. Також в цю родину входять деякі з колишніх представників роду *Azotobacteriaceae*, родини азотфіксуючих бактерій, які включають *Azomonas* і *Azotobacter*. Таксономія *Pseudomonas* зазнала значної ревізії, оскільки секвенування генів рибосомної РНК викликало велике репозиціонування членів роду (53). Рід визначається таксономічно за фенотипом, біохімічними та фізіологічними ознаками, аналізом клітинних жирних кислот та геномним аналізом. Інші послідовності генів, включаючи бетасубодиницю гірази ДНК (*gryB*), фактори РНК-полімерази *groD* та *groV* та ліпопротеїни зовнішньої мембрани *oprI* та *oprF*, були використані у філогенетичних дослідженнях та у визначенні видів. Сидерофорна структура, включаючи флуоресцентний пігмент піовердин, також була описана як корисний таксономічний маркер (53). В даний час понад 200 видів *Pseudomonas* мають схвалені назви, і щороку нові види ідентифікуються як члени цього роду. Зв'язок *Azomonas* і *Azotobacter* з *Pseudomonas* останнім часом розглядається через схожість їх екологічних ніш і метаболічних шляхів, таких як дихальні механізми, виробництво альгінатів та фіксація азоту, а також на основі філогенетичної подібності генів 16S рРНК та інших геномних маркерів. Ці організми можна вважати видами роду *Pseudomonas* і вони мають найбільшу спорідненість до *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* має дихальний метаболізм, за якого кисень є кінцевим акцептором електронів; у деяких випадках таку роль може виконати

нітрат, а потім ріст відбувається анаеробно. Вони рухаються за допомогою одного або декількох полярних джгутиків і мають вигляд хвилястих паличок довжиною 5-5.0 мм з діаметром 0.5-1.0 мм. Вони хемоорганотрофні і не вимагають органічних факторів росту, каталаза-позитивні і зазвичай оксидаза-позитивні, не дуже толерантні до кислот і не ростуть нижче рН 4.5.

*Pseudomonas syringae* - це грамнегативна, палочкоподібна бактерія з полярними джгутиками (54). Штами *P. syringae* інфікують найрізноманітніші рослини. Різні штами *P. syringae* однак, відомі своєю різноманітною і специфічною для господаря взаємодією з рослинами (55). Конкретний штам може бути специфічним і належати до одного з принаймні 40 патоварів, заснованих на діапазоні хазяїв серед різних видів рослин (56), а потім додатково виокремлений на основі диференціальних взаємодій серед сортів рослини-хазяїна. Розуміння молекулярної основи цього високого рівня специфічності господаря було рушійною силою у використанні *P. syringae* як моделі для вивчення взаємодії хазяїн-патоген. На полях сільськогосподарських культур інфіковане насіння часто є важливим джерелом первинного інокулюму при захворюваннях *P. syringae*, а епіфітний бактеріальний ріст на листових поверхнях часто передує розвитку хвороб (55). *P. syringae* потрапляють в тканини господаря (зазвичай листя) через рани або природні отвори, такі як продихи, і в сприйнятливій рослині вона розмножується до високої концентрації у міжклітинних просторах. Інфіковані листя мають бактеріальні плями, які з часом стають некротичними. Залежно від штамів *P. syringae* некротичні ураження можуть бути оточені дифузним хлорозом. Деякі штами *P. syringae* також викликають пухлини і пожовтіння (54). У стійких рослин, з іншого боку, *P. syringae* викликає гіперчутливу відповідь - швидку і пов'язану з захистом загибель клітин рослин при контакті зі збудником (57–61). У цій ситуації *P. syringae* не розмножується до високого рівня популяції і не викликає симптомів захворювання.

У 1980-х *P. syringae* була першим патогеном, який був запропонований для інокуляції *Arabidopsis* і викликав симптоми хвороби в лабораторних умовах. Це було досягнуто шляхом скринінгу багатьох штамів *P. syringae* на різних *A.thaliana* (60,62,63). Два вірулентні штами, що найбільш широко використовуються сьогодні - *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 і *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326, - походять від цих ранніх досліджень. Коли суспензія бактерій із концентрацією  $10^8$  КУО/мл (висока доза бактерій) інокулюється на сприйнятливі рослини *A.thaliana* (наприклад, екотип Col-0), першою ознакою хвороби є поява «змочених водою» плям на листках на другий день. Цей симптом виникає внаслідок масового вивільнення води і, ймовірно, поживних речовин з інфікованих клітин *A.thaliana*. Ці плями стають некротичними і темнішають на третій день, а навколо, в листковій тканині, можна спостерігати сильний хлороз, що дає характерний вигляд «плямистої» хвороби. Крім того, тісно пов'язані, але авірулентні штами (наприклад, *P. syringae* pv. *tomato* JL1965 і *P. syringae* pv. *maculicola* M2), які стали джерелами деяких авірулентних (*avr*) генів, також були ідентифіковані. Основною причиною вивчення штамів *P. syringae* як потенційних патогенів *A.thaliana* було те, що *P. syringae* вже була показана як детально досліджений збудник сої, томатів і бобів в середині 1980-х років (64). Система *A.thaliana* - *P. syringae* таким чином представляє з себе стійку систему, яка є досконало вивчена і є передбачуваною моделлю для використання у експериментах.

Окремо треба згадати про особливість вірулентності даних бактерій. Тип III є ключовим фактором вірулентності для багатьох грамнегативних бактерій, включаючи *Pst* DC3000 (65–71). Секвенування геному в поєднанні з кількісними та функціональними дослідженнями значно полегшило ідентифікацію ефекторів серед штамів *P. syringae* (72). У *Pst* DC3000 було підтверджено, що принаймні 28 ефекторів є повністю активними та достатньо вираженими, щоб бути виявленими за допомогою аналізу транслокації

ефектора типу III (73). Вісімнадцять з 28 ефекторів кодуються в кластерах генів, включаючи збережений ефекторний локус (CEL) і обмінний ефекторний локус (EEL), який фланкує кластер генів *hrp* на локусі патогенності *Hrp*. Інші ефектори поширені в геномі (74–76).

### 1.2.2. Характеристика роду *Serratia*

*Serratia* — умовно-патогенні бактерії. Рід складається з 11 видів: *S. entomophila*, *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. grimesii*, *S. quefaciens*, *S. marcescens* (типовий вид), *S. odorifera*, *S. plymuthica*, *S. protamaculans*, *S. quinovorans*, *S. rubidaea*. Можна ідентифікувати в ґрунті, воді, різних харчових продуктах і препаратах, включаючи лікарські, в шлунково-кишковому тракті гризунів і комах. Найчастіше захворювання у людини викликає *S. marcescens* (77). *Serratia* викликають харчові токсикоінфекції, сепсис, пневмонію і інфекцію сечовивідних шляхів (78). Бактерії роду *Serratia* — прямі палички (0,5-0,8 x 0,9-2,0 мкм), рухливі (перітрихіальні). Мають O-, H-антигени, факультативні анаероби. Утворюють пігмент червоного кольору — протігіозин. Стійкі до багатьох антибіотиків. Фактори патогенності: пілі, гемолізін, цитотоксин, протеази.

Види родів *Salmonella*, *Serratia*, *Enterobacter* та *Enterococcus* частіше трапляються у випадках внутрішньогоспітальних інфекцій, а саме харчових отруєнь та сепсисів (79–82). Останні дослідження, однак, доводять, що ці патогенні для людини бактеріальні види також мають здатність колонізувати та спричинювати захворювання у широкого спектру рослин. Але треба зважати на те, що більшість цих дослідів були проведені у лабораторних умовах, тоді як розвиток рослинних захворювань, спричинених цими патогенами у природньому середовищі, досі залишається не вивченим.

*S. marcescens* була описана як збудник, що викликає захворювання жовтої виноградної лози в *Citrullus lanatus* і *Cucurbita pepo* (83), м'яку гниль в *Capsicum annuum* (84), гниль кукурудзи *Zea mays* (85), жовту плямистість (86), хворобу коренів *Cannabis sativa* (87) і чорну хворобу плодів *Citrus sinensis*. *S. marcescens* може бути шкідливою для рослини в одних випадках, але корисною в інших. Наприклад, штам *S. marcescens* 90-166 був описаний як рослинний стимулятор, що сприяє ризобактеріям, внаслідок чого може викликати системну стійкість огірка до різних патогенних агентів, включаючи бактерії, гриби і навіть віруси (88).

### 1.2.3. Характеристика роду *Pantoea*

Рослинні патогени мають широкий спектр факторів патогенності, вони адаптувались до рослинного організму, виробили успішні шляхи розвитку захворювань та розповсюдження (89). Але деякі з цих патогенів можуть викликати захворювання і у людей. Рід *Pantoea*, наприклад, наразі включає сім видів: *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea citrea*, *Pantoea dispersa*, *Pantoea punctata*, *Pantoea stewartii* та *Pantoea terra* (90–94). Відомо, що ці патогени викликають хвороби рослин. *P. agglomerans* спричинює гниль цибулі та хвороби кореня буряку, *P. ananatis* є збудником бактеріальної плямистості евкаліпту, коричневої гнилі стебла кукурудзи (95) та некрозу рису (96), а *P. citrea* викликає рожеву хворобу ананаса. Секреторна система III типу (ТЗСС) є головним фактором патогенності для багатьох видів роду *Pantoea*, що дозволяє їм запускати розвиток захворювання шляхом вприскування бактеріальних ефекторних білків, які виключають захисний сигналінг рослинних клітин (97). Відомо, що патовари *P. agglomerans gypsophilae* та *betae* використовують ТЗСС для формування гал (97). В той час, як *P. agglomerans* pv. *betae* індукує формування гал як у лищиці, так і у буряка, *Pantoea agglomerans* pvs. *gypsophilae* формує їх тільки у буряка. Спектр хазяїв

регулюється частково ефекторним білком III типу PthG, який розпізнається в організмі буряку і це спричинює захисну відповідь, але функціонує як фактор вірулентності у лищиці (98). Маніпуляція з рослинними гормонами може спричинити формування гал і підтверджує пристосування рослинних патогенів до рослинних систем.

Не дивлячись на пристосування до рослин, види роду *Pantoea* також здатні інфікувати людський організм. Відома сьогодні як людський патоген, *P. agglomerans* була причиною спалахів септицемії, спричинених контамінацією пляшок для інфузійних розчинів (99). Відомі також випадки контамінації *P. agglomerans* розчинів для внутрішньовенозного введення, парентерального харчування, продуктів крові, що спричинює появу важких захворювань або навіть смерті (100–105). *P. agglomerans* також була виділена з аналізів пацієнтів, хворих на артрити та остеомієліти, де інфекція могла розвинути після поранення шматочками дерева, шипами різних рослин (106–108). Такі випадки також зафіксовані для таких бактерій як *P. ananatis*, *P. septica* та *P. dispersa*, які відомі за свою здатність викликати захворювання у цибулі та цукрової тростини, але були ідентифіковані у багатьох випадках бактеріємії та септицемії. Філогенетичний аналіз рослинних та клінічних ізолятів показав, що вони нічим не відрізняються, що робить менш зрозумілим їх патогенний потенціал у їх рослинних та тваринних хазяїв (109).

### **1.3. Характеристика фітобактеріозів**

Фітобактеріоз – це складний патологічний процес, який призводить до змін в метаболізмі та фізіології ураженої рослини. Існує два типи фітобактеріозів в залежності від дії на рослину та ступеня ураження: дифузні (системні) і локальні (місцеві).

У випадку дифузного бактеріозу збудник транспортується по провідним пучкам і прилеглим тканинам. Внаслідок цього порушується процес надходження води, і рослина починає в'янути. Саме в'янення є головним симптомом дифузних бактеріозів. Процес в'янення пов'язаний із втратою рослинами тургора, що призводить до патологічних змін в тканинах, окремих органах або у всій рослині. Спочатку відбувається закупорювання судинних пучків окремих органів, а далі – всієї рослини.

Локальні бактеріози проявляються в ураженні паренхімної тканини окремих органів рослин. Головними ознаками локального бактеріозу є некрози, хлорози, гнилі та пухлини. Локальне утворення гнилі спостерігається, наприклад, при ураженні плодів абрикоса (побуріння плодів). Гниль локалізується біля кісточки плоду; хвороба викликається ґрунтовою спороутворюючою бактерією *Bacillus mesentericus*. Для деяких бактеріозів характерна поява бактеріального ексудату. Його виділяють *Erwinia amylovora* (збудник бактеріального опіку плодових), *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (збудник кутастої плямистості огірка), *Xanthomonas phaseoli* (збудник бактеріозу квасолі). Ексудати також можуть утворювати інші мікроорганізми за відповідних умов, наприклад, високої вологості повітря. Відомі випадки, коли бактерія викликає одночасно декілька симптомів ураження. Наприклад, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, - збудник бактеріального раку томатів, - викликає в'янення всієї рослини, розтріскування стебел і плямистість плодів («пташине око»), а збудник чорної ніжки картоплі - *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* – викликає як в'янення стебел в період вегетації, так і гнилі бульб в той самий період і при зберіганні (рис.1.1.).

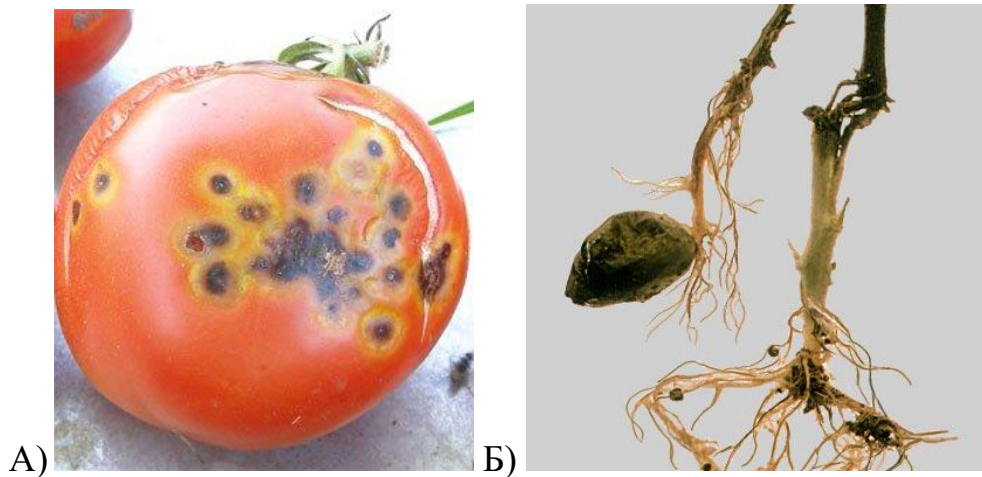


Рис. 1.1. Різні типи прояву бактеріальних захворювань: А) плямистість плодів томатів (110); Б) чорна ніжка картоплі (111).

Загальними ознаками для всіх збудників фітобактеріозів є патогенність, вірулентність та агресивність. Патогенність є мірою здатності бактерії викликати захворювання; вірулентність – це спектр рослин, які може інфікувати збудник, а агресивність – швидкість та масовість ураження рослин. Проникнення збудника можливо за допомогою комах, через механічні пошкодження, через природні ходи рослин. Факторами фітопатогенних властивостей рослин є певні ферменти. У таких збудників є протеази, пектинази і протопектінази, що розщеплюють пектинові речовини і оболонки клітин; амілази, які гідролізують крохмаль; хлорофіллази, що розщеплюють хлорофільні зерна, внаслідок чого втрачається зелене забарвлення ураженої тканини і з'являються світлі плями, хлорози.

## **1.4. Методи боротьби з фітобактеріозами**

### **1.4.1. Хімічні методи боротьби**

Найбільш часто використовуваними стратегіями контролю є антибіотики (наприклад, стрептоміцин) і препарати на основі сполук міді (112,113).

Широке застосування антибіотиків в сільському господарстві, однак, призвело до еволюції стійкості до антибіотиків серед декількох фітопатогенів. Стійкість до стрептоміцину спостерігалася в генах *Erwinia*, *Pseudomonas* і *Xanthomonas* sp. (114–116) (наприклад, strAB); горизонтальне перенесення генів призводить до поширення стійкості до антибіотиків. У рослинництві США для ліквідації хвороб, викликаних бактеріями, у фруктових, овочевих і декоративних культур застосовується стрептоміцин, і для деяких фруктових культур - окситетрациклін. Спочатку обидва антибіотика використовували для лікування тільки бактеріальних інфекцій, проте виявилось, що стрептоміцин може застосовуватися в невеликих дозах також для лікування захворювань, викликаних водною цвіллю, а окситетрациклін - захворювань, викликаних фітоплазмами. Так як антибіотики є найдорожчими пестицидами, використовуваними для овочевих і плодових культур, і їх ефективність обмежена, рослинники повинні упевнитися, що необхідні антибіотичні речовини проявляють достатню активність щодо патогена. Обмежити застосування антибіотиків можна за рахунок посадки рослин, стійких до хвороби, а в деяких випадках залучаючи методи біологічного контролю, наприклад, використовуючи сапрофітні бактерії, які є антагоністами патогенних бактерій. Механізм дії цих мікроорганізмів на шкідників рослин включає конкуренцію за харчування, ефективну колонізацію ризосфери і листових поверхонь. Крім того, ці мікроорганізми синтезують антибіотичні речовини, що стимулюють ріст рослин. Однак цей метод біологічної боротьби з фітопатогенними мікроорганізмами розвинений слабо; лише невелика кількість препаратів, отриманих з бактерій і грибів, - антагоністів шкідників рослин, - використовується на практиці. Тому, незважаючи на зусилля з обмеження залежності від антибіотиків, вони продовжують відігравати велику роль в лікуванні бактеріальних інфекцій у багатьох культурних рослин. Використання антибіотиків в сільському господарстві в якості стимуляторів

призвело до появи бактерій, резистентних до антибіотиків, і передачі генів-переносників людині (117).

Пізніше з'явився більш перспективний засіб для контролю захворювань. Часто ці хімічні речовини називають активаторами захисту рослин. Вони імітують фітогормони, які в свою чергу індукують системну набуту резистентність — SAR — в рослині. Такий метод мав успіх у боротьбі з групою бактеріальних захворювань, таких як бактеріальна плямистість томатів та перцю, в'янення листів цибулі та опіки яблунь. Однак мали місце і негативні ефекти. В певних видах рослин ці активатори були причиною зменшення врожаю, тоді як з іншими патосистемами вони взагалі були неефективними. Зміна методики обробки (обробка безпосередньо кореня рослини замість звичайного спрею) не принесла позитивних змін в дії цих активаторів. Як виявилось, вони потребують інтеграції з іншим ефективним хімічним компонентом.

Протягом багатьох років використовували препарати на основі мідного купоросу. Як хімікат для контролю бактеріальних хвороб рослин він використовувався найширше. Безперервне використання міді призводить до її накопичення в навколишньому середовищі, що призвело до виникнення проблем здоров'я людини, токсичного впливу на флору і фауну і розвитку мідно-толерантних фітопатогенів (118,119). Проблеми здоров'я людини і тварин, зумовлені токсичністю міді, включають захворювання шлунково-кишкового тракту, печінки, репродуктивні та нейродегенеративні розлади, такі як хвороба Альцгеймера (120,121). Симптоми надлишку міді в рослинах включають порушення росту коренів і пагонів, хлороз, пошкоджені фотосинтетичні пігменти і іноді призводять до смерті рослини (122). Наночастинки оксиду міді також перешкоджали швидкості проростання і росту коренів і пагонів ярого ячменю (*Hordeum sativum distichum*) (123). Стійкість до бактерицидів на основі міді також є проблемою в контролі

фітопатогенних бактерій. Стійкість до міді спостерігалася у багатьох фітобактеріях, включаючи *Pseudomonas* і *Xanthomonas* spp. (124). В одному дослідженні повідомляли, що 80% з 35 штамів *P. syringae* pv. *phaseoli*, виділених з полів квасолі, проявили стійкість до міді (125). Це викликає велике занепокоєння, враховуючи, що застосування міді багато років було основним методом контролю для цих фітопатогенів. Кілька країн або заборонили, або обмежили використання засобів на основі міді.

#### 1.4.2. Біологічні методи боротьби

В якості екологічно безпечних засобів боротьби використовують різні методи, одним з яких є біоциди, препарати на основі непатогенних штамів мікроорганізмів або окремі їх компоненти. До біологічних засобів захисту рослин також належать бактеріофаги. Інтерес до фагів як агентів біоконтролю пояснюється їх нетоксичною природою для еукаріотичних клітин, специфічністю хазяїна, здатністю долати бактеріальну резистентність, а також легкість їх виробництва. Найважливішими детермінантами потенційної придатності фагів як біоконтрольних агентів є літична або лізогенна (помірна) схема життєвого циклу та специфічність господаря. Помірні фаги заражають клітини господаря і або зберігаються як епісоми, або інтегруються в геном господаря в стані профагу (126). У профаговому стані, різні фагові гени замовчуються, тому пригнічують експресію білків, які викликають збір віріонів і лізис бактеріальних клітин. Отже, профаг відтворюється разом з бактеріальним геномом, однак він може перейти до літичного циклу. Літичні фаги заражають і використовують метаболізм клітин господаря для реплікації, що призводить до лізису клітини господаря і вивільнення фагових віріонів. Зазвичай визнається, що лізогенних фагів слід уникати як життєздатних біоконтрольних агентів, оскільки: 1) багато помірних фагів можуть викликати поширення патогенних генів за допомогою трансдукції; 2) помірні фаги

можуть призвести до суперінфекції; 3) певні помірні фаги володіють генами, які можуть перетворити бактерії-хазяї на більш патогенні; 4) менш ефективні у лізисі хазяїна (127). Інша особливість фагів, що відрізняє їх від антибіотиків, полягає в тому, що фаги специфічні для бактерій-хазяїв. Деякі фаги настільки специфічні, що заражають лише один або кілька бактеріальних штамів одного виду. Ця функція корисна для підтримки мікробної екосистеми, але вимагає використання фагових сумішей (коктейлів) як біоконтрольних агентів через генетичну різноманітність фітопатогенів. Фагові коктейлі зазвичай використовуються з двох основних причин. По-перше, для націлювання на різні патогени (або різні види, що викликають подібне захворювання або різні штами одного виду). Як згадувалося вище, фаги часто проявляють специфічність господаря. Отже, це обмежує застосування одного фага при націленні на різні фітопатогени. В результаті, кілька фагів різних хостів можуть бути зібрані в коктейль, який розширює спектр бактерій-мішеней. Тому важливо, щоб перед приготуванням фагового коктейлю був визначений необхідний діапазон фагів. По-друге, фагові коктейлі використовуються для запобігання розвитку стійких до фагів бактерій. Постійна гонка озброєнь між фагами і бактеріями призвела до еволюції декількох механізмів стійкості фагів в бактеріях, таких як пригнічення адсорбції фагів і введення ДНК, абортівна інфекція, імунна система CRISPR/Cas, і системи модифікації обмежень. Використовуючи більше одного типу фага, цільові бактерії не будуть розвивати стійкість до всіх фагів відразу.

## РОЗДІЛ 2

### ФАГОТЕРАПІЯ

#### 2.1. Використання препаратів на основі бактеріофагів

Бактеріофаги в якості лікувальних антимікробних агентів є однією із найбільш перспективних сучасних напрямів у боротьбі з патогенними (як для людей/тварин, так і для рослин) мікроорганізмами. Практичне застосування фагів передбачає їх виділення із природи, ретельний аналіз передумов дозволяє виявити віруси в центрі інфекційного процесу. Простежується наступна динаміка розвитку інфекції та репродукції фагу: поява визначеного бактеріофагу на рослині дуже тісно пов'язана із розвитком хвороби, спричиненої бактерією. На початку інфекційного процесу фаг може не виявлятися на хворих рослинах; далі вірус знаходять лише в низьких титрах; максимальна концентрація фага визначається, як правило, в розпалі хвороби або після її перенесення рослиною. В кінці захворювання титр фага різко знижується, оскільки немає чутливих до лізису мікроорганізмів.

Створення препаратів на основі фагів для контролю фітопатогенних бактерій є актуальним у світі і протягом останніх років роботи у цьому напрямку не припиняються. Наразі існує декілька відомих комерційних препаратів, що застосовуються для лікування бактеріальної плямистості, викликаной *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *P. syringae* pv. *tomato*, *Clavivacter*, *Erwinia* – це «AgriPhage» компанії OmnyLytics (Іллінойс, США), «Пентафаг-С» (Україна) та «Biolyse®-PB» компанії APS BIOCONTROL (Сполучене Королівство, Шотландія). Титри бактеріофагів в таких препаратах зазвичай високі (більше  $10^6$ ), вони ефективно пригнічують розвиток вже наявних інфекцій на рослинах, попереджають їх появу, сповільнюють псування готового продукту на полиці. Biolyse навіть надають графіки ефективності даного препарату, особливо наголошують на обробці ним упакованого салатного листя (<https://www.apsbiocontrol.com/case-studies>).

Проте такі препарати мають постійно модернізуватися, склад фагів – оновлюватися, а фермери різних країн розуміти, що фаги, які мають ефект на полях Сполучених Штатів, можуть не бути ефективними в Україні, оскільки бактеріальні штами і відповідно їх сприйнятливість до певних фагів можуть відрізнятися.

## **2.2. Переваги та недоліки застосування фаготерапії**

Важливою перевагою фагів є їх екологічна безпечність, оскільки вони мають природне походження та легко «розкладаються». Варто врахувати можливість їх сумісного застосування в комбінованій терапії із іншими антибактеріальними препаратами. Також препарати на основі фагів застосовуються разом із фунгіцидами, інсектицидами та опилювачами рослин. Віруси бактерій не впливають на товарні та смакові якості сільськогосподарської продукції. На відміну від бактерицидних сполук, бактеріофаги не пошкоджують машини, що використовуються у сільськогосподарській роботі. Обробку рослин препаратами фагів можна проводити на різних стадіях розвитку рослин, починаючи із насіння.

Наряду з перевагами, у бактеріофагів існує ряд недоліків. Одним із основних – можливість інактивації фізико-хімічними факторами. Успіх застосування препарату на основі фагів залежить від здатності вірусу долати певні бар'єри та інфікувати бактерію до того, як він інактивується під дією факторів навколишнього середовища. Лабораторні дослідження показують, що фаги інактивуються під дією високих температур, ультрафіолету, тому обробку рослин препаратами рекомендується проводити у другій половині дня чи рано вранці (128), високими та низькими значеннями кислотності.

Негативною рисою фагових препаратів у порівнянні з хімічними є ще те, що фаги є складними організмами, які можуть передавати гени токсинів між

бактеріями; термін зберігання фагів змінюється і потребує перевірки і моніторингу; бактеріофагами складніше управляти, ніж антибіотиками. Спеціаліст повинен мати спеціальну підготовку для того, щоб правильно призначати і використовувати фаги; як вже зазначалося раніше, висока специфічність цих вірусних агентів має окрім позитивних і негативні наслідки, а бактерії можуть набувати резистентності до бактеріофагів.

Відомо, що активний препарат фагів повинен відповідати ряду вимог. Слід зазначити, що зазвичай є кілька основних аспектів виробництва фагових препаратів, призначених для використання в терапії та профілактиці бактеріальних інфекцій: широкий спектр літичної активності препарату по відношенню до існуючих біотипів збудника (досягається за рахунок полівалентної чи складної природи препарату); висока вірулентність окремих компонентів препарату та їх висока концентрація; стабільність літичної активності препарату з плином часу.

### 2.3. Сучасні проблеми фаготерапії

Дослідження фагів націлені на найбільш поширені і шкодочинні збудники рослин. В останні роки фаги були ізольовані із бактеріальних зразків, що уражають більшість культур, особливо тих, що викликають великі втрати врожаю картоплі, капусти та моркви. Ізольовані літичні бактеріофаги, специфічні для *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*, *P. wasabiae* і *Dickeya solani*, значно зменшили симптоми м'якої гнилі на бульбах картоплі принаймні на 80% у порівнянні з контролями, щепленими тільки сумішшю бактерій (129). Т4-подібні фагові коктейлі були ефективними проти *D. solani*, як видно зі зниженої захворюваності на бульбах картоплі в лабораторних аналізах (6). Фаги *Pectobacterium atrosepticum* були успішно використані для запобігання гниття зібраних бульб картоплі (7,130). Загалом, фаги або фагові коктейлі були доведені ефективними на етапі збору врожаю. У цьому випадку

овочі повинні бути оприскувані/вимиті в фагах, що містять розчини для створення захисної плівки на рослинній поверхні. В той же час ще не було описано взаємодій між рослинами та фагами. Більшість досліджень проводяться в лабораторних або тепличних умовах, в той час як справжні польові умови залишаються менш дослідженими. Наприклад, фаги *Pectobacterium odoriferum*, руйнівного патогена, що викликає бактеріальні захворювання на різних овочах, пригнічували бактеріальний ріст в розсаді лициці (8). Обприскування листя салату суспензією фагів *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* знизило відсоток хворих рослин (131). Також, обприскування специфічними фагами, виділеними з *Erwinia amylovora* на відкритих квітках яблуні, зменшило появу симптомів (132). Фаги, специфічні до патогена картоплі *Streptomyces scabies*, значно зменшили площу ураження в оброблених бульбах без істотного впливу на біомасу, розмір або кількість рослин, вирощених з цих бульб (133). Ще один експеримент з фагами *Streptomyces scabies* показав значно знижену втрату ваги у заражених рослин (134). Цікаво, що більшість фагів, які використовуються для біоконтролю, відносять до хвостатих фагів (в основному належать до *Podoviridae* або *Myoviridae*), тоді як використання ниткоподібних фагів також має високий потенціал (135).

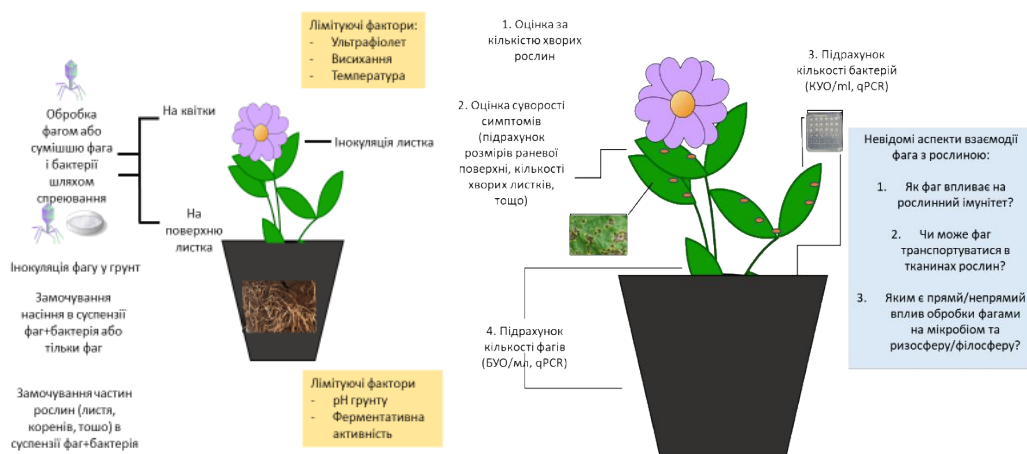
Біоконтроль фагів досить успішно застосовується до ряду збудників культур в тепличних або польових умовах. До них відносяться збудники родів *Xanthomonas* (бактеріальна пляма томату, персика, герані та цитрусових, цибулевий фітофтороз, горіх і пухлини цитруссів) (136,137), *Ralstonia* (бактеріоз тютюну) (138–141), *Erwinia* (фітофтороз, бактеріальна м'яка гниль) (132,142–145), *Agrobacterium* (гало томатів) (146,147) і *Pseudomonas* (бактеріальна плямистість томату, бактеріальна плямистість грибів) (40,148,149). Наприклад, фаги *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* були використані у лікуванні томатних рослин (150). Потенційний кандидат на

фаготерапію проти *X. oryzae* був успішно протестований на рисі (151). Фаги *X. axonopodis* pv. *allii* лізував значну кількість бактерій в цибулі (137), а фаги, специфічні до *X. axonopodis* pv. *citri*, зменшували захворюваність і вираженість симптомів у попередньо оброблених рослин грейпфрута (152). Фаги *Pseudomonas syringae* pv. *porri* зменшують довжину ран, викликаних бактеріальною гниллю в цибулі (40). Фаги *P. tolaasii* виявилися ефективними проти бурого плямистого захворювання грибів устриць (149). Перспективні результати біоконтролю *P. syringae* pv. *syringae* специфічними фагами були отримані при профілактиці захворювань у вишневих дерев (148,153). Поширення *P. syringae* pv. *actinidae*, збудника хвороб ківі, що суттєво впливає на фруктові сади, успішно пригнічується фагами, безпосередньо інокульованими в заражене бактеріями листя (37,39,154). Томатний патоген *P. syringae* pv. *tomato*, відомий також як модельний патоген для *Arabidopsis thaliana*, є ще однією важливою мішенню для фагових мисливців. Наприклад, фаги FRS (*Podoviridae*) і SHL (*Myoviridae*) значно зменшили кінцеві симптоми захворювання, викликані інокуляцією *P. syringae* pv. *tomato* в томатному листі (155) і прогресування хвороби в інфікованій розсаді томатів (156).

Вражаюче число нових фагів з високим потенціалом біоконтролю було представлено в останні роки, тому необхідність уніфікації протоколів тестування ефективності стає очевидною. На даний момент для моделювання потенціалу фагів в лабораторних умовах і польових випробуваннях були використані різні підходи і методи. На сьогоднішній день досі не прийнято стандартний протокол для оцінки ефективності терапевтичної дії фагів. Деякі дослідження покладаються на візуальну оцінку симптомів, інші зосереджуються на біомасі рослин, в той час як тільки рідкісні роботи враховують бактеріальну та/або фагову кількісну оцінку в тканинах. Наприклад, дослідження, зосереджені на зберіганні культур після їх збору (наприклад, картоплі або моркви), часто покладаються на візуальні шкали для

оцінки ефективності фагів (138,139,141). Для цього дослідники розробляють шкалу симптомів, специфічну для кожного експерименту. Такий підхід дійсно дуже зручний через низькі витрати і коригування; однак, досить важко екстраполювати результати на інші експерименти або порівняти ефективність продукту в інших випробуваннях. Оскільки велика мета полягає в тому, щоб дослідити, чи є деякі фаги хорошими кандидатами для використання в фаготерапії, здається вірним покладатися на розвиток симптомів, біомасу рослин та якість рослинної продукції. Однак при такому підході неможливо виключити можливість безсимптомного бактеріального розвитку, що може призвести лише до тимчасового ефекту фагових продуктів. Інший, більш точний, підхід - це пряма кількісна оцінка БУО (бляшко утворювальних одиниць), що використовується, наприклад, в експериментальній інокуляції заражених рослин *Ralstonia solanacearum* (140), профілактичній обробці фагами *Xanthomonas oryzae* в розсаді рису або лікування інфекції у цибулі (137). Для стандартизації автори нормалізували кількість фагових частинок до біомаси оброблених тканин рослин. Однак найбільш точним (хоча і рідко застосовуваним) методом є кількісне визначення фагової ДНК за допомогою qPCR (157) і нормалізація її до числа бактерій, виміряних як КУО (колонієутворювальні одиниці). Крім того, були проведені обмежені дослідження впливу фагів на мікробні спільноти, і найчастіше такі дослідження стосуються лише ґрунтового мікробіому (158). Дійсно, ризосферні фаги мають потенціал для модуляції структури ґрунтового бактеріального біому та колообіг органічних речовин (159). Фаги можуть впливати на доступність поживних речовин рослин через потенційний вплив на трофічну мережу ґрунту, керуючи мутаціями або регулюючи експресію генів у вибраній бактеріальній ніші (135,160,161). Коктейль з п'яти фагів був достатнім для зміни бактеріального біому не тільки при інокуляції в стерильному ґрунті під час і після колонізації ґрунту бактеріями, але і в природному ґрунті (162). Додавання фагів впливає на мікробні хімічні

процеси в ґрунті, такі, як обіг азоту. Це може бути пов'язано з лізисом клітин господаря за допомогою фагів, що призводить до виділення органічного азоту з подальшою його мінералізацією. Вивчаючи поведінку фагів в контексті філосфери, Морелла та колеги (163) перенесли мікробні спільноти з польових рослин томатів до молодих рослин, вирощених в переважно стерильних умовах за наявності або відсутності асоційованої фагової спільноти. У цих експериментах листя томатів було обприскуване фаговими суспензіями або міксами фагів з бактеріями, а також проаналізований склад листково-асоційованого мікробіома. Під час експериментів автори спостерігали зменшення загального бактеріального різноманіття через 24 години після спреювання припускаючи, що фаги вплинули на зростання найпоширеніших і/або найшвидше зростаючих бактеріальних штамів під час колонізації нового хазяїна рослини. Однак загальне зменшення бактеріального різноманіття не обов'язково було очікуваним результатом для літичних фагів. Навпаки, лізис, опосередкований фагом, може збільшити загальний ріст бактеріальної спільноти через виділення поживних речовин у навколишнє середовище (164,165).



А)

Б)

Рис. 2.1. Стандартні методи інокуляції фагами рослин та оцінка результатів: А) методи обробки рослин фагами; Б) методи оцінки результатів після обробки

Основна суть прямого впливу фагів на мікробіом полягає у лізисі цільових бактерій і тому, щоб залишити простір для груп, стійких до фагів (164,166). Тим не менш, незрозуміло, чи можуть екологічні та еволюційні процеси резистентності фагів, які були експериментально перевірені *in vitro*, пояснити закономірності, що спостерігаються в природних спільнотах. Дослідження на цю тему були зроблені Ернандесом і Коскеллою (167). У цій статті автори використовують літичні фаги та їх бактеріального хазяя *P. syringae*, щоб забезпечити пряме порівняння еволюції стійкості фагів між двома різними середовищами: високопоживним середовищем (*in vitro*) та томатами (*in planta*). Вони показали швидко утворювану і часту стійкість до фагів, що відбувається *in vitro*, але не *in planta* через відмінності в ресурсах, які потрібно затратити на встановлення цієї стійкості. З іншого боку, нижча частота фагового опору *in planta* може бути пояснена розпадом фагів з плином часу, відсутністю реплікації фагів або втратою вірулентності фагів. Ця робота показує, що ефективність сільськогосподарської фаготерапії може бути обмежена більш низькою реплікацією фагів, а не високими темпами еволюції резистентності в бактеріях. Аналогічним чином, дослідження медичних бактеріофагів повідомляють, що частота резистентності, що розвивається *in vivo* під час фаготерапії, значно нижча порівняно з показниками резистентності *in vitro* (168).

Додатковою проблемою застосування фаготерапії на полях є відсутність знань про можливі взаємодії між фагами та рослинами. Прийнято вважати, що фаги не взаємодіють безпосередньо з рослинами. Однак у рослин виявлено ряд фагоподібних генів (9). Цікаво, що вплив фагів на рослинних господарів часто не помічають. Загальноприйнятий спосіб представлення успішного випробування фагових препаратів -показати фотографію рослини з симптомами хвороби навпроти безсимптомної. Однак вплив фагів *per se* на метаболізм рослин погано досліджений, як і сигналінг, ініційований

розпізнаванням продуктів лізису фагів, тобто суміші фагових частинок з рештками бактеріальних клітин після лізису. Дійсно, деякі фагові продукти діяли більш ефективно разом з SAR-індукторами (137,150,169) і зменшували інтенсивність гіперчутливої реакції при збереженні антибактеріальної ефективності (170). Наприклад, рослини, оброблені ацибензолар-S-метилом, проявили некротичні симптоми протягом 48 годин після інокуляції бактеріями, показавши гіперчутливий тип реакції. З іншого боку, рослини, оброблені комбінацією ацибензолар-S-метилу і фагів, практично не виявили симптомів, оскільки застосування фагів зменшило бактеріальну популяцію на листовій поверхні, тим самим зменшивши інтенсивність реакції рослин. Значне зниження інтенсивності реакції рослин також було досягнуто при застосуванні до того ж листя (170) ацибензолар-S-метилу, ізольований бактеріальний білок-шпильку і фаги. Далі залишається незрозумілим, чи здатні фаги проникати в тканини рослин (через природні отвори, такі як продихи, механічні рани), а якщо так - чи залишаються фаги вірулентними всередині рослин і як довго. Фаги були виявлені у верхніх тканинах рослин томатів аж до 15 днів після інокуляції ґрунту, в залежності від стану здоров'я коренів (оскільки пошкодження коренів зменшило адсорбційну здатність фага) (171). Однак стійкість фагів була вище на листочках з рослин, спільно оброблених фагами і ослабленими бактеріальними штамами в порівнянні з листочками, які отримали тільки фаг. Таким чином, припускається, що застосування ослаблених штамів бактерій може продовжити життєздатність фага всередині рослин. В експериментах Колосваріне та ін., специфічні до *Erwinia amylovora* бактеріофаги були здатні до транслокації в тканини саджанців яблуні, і були виявлені за допомогою qPCR в надземних частинах рослин після нанесення на коріння. Фаги можуть бути виявлені в коренях після обприскування їх на листках і стеблі (172). Цікаво, що попередня обробка рослин фагами і наступний вплив природних бактеріальних спільнот зменшили накопичення амінокислот і азотовмісних сполук, одночасно

збільшивши накопичення цитрату (173). Автори припустили, що наявність фага стимулювала перетворення амінокислотного вуглецевого скелета в проміжний цикл Кребса, з метою підтримки мітохондріального обміну і синтезу АТФ.

Отже, схема дії різних видів фагів досить мінлива, також фаги можуть вести себе по-різному в умовах *in vivo* і *in vitro*. Потрібно проводити більше досліджень для розшифрування фагової дії *in vivo*, особливо у взаємодії фаг-бактерія-рослина, оскільки кожен учасник може визначити результат цієї взаємодії.

## РОЗДІЛ 3

### ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 3.1. Джерела бактерій та бактеріофагів

Культуру *Serratia marcescens* IMBG291 надав Інститут молекулярної біології і генетики НАН України. *Pantoea agglomerans* було виділено зі зразків цибулі з ознаками бактеріозу, яку зібрали з сільськогосподарських угідь Київської області та ідентифікували, використовуючи біохімічні методи. Бактеріофаги до цих бактерій було виділено зі стічних вод, що відібрали з Бортницької станції аерації (м. Київ). Для виділення бактеріофагів використовували метод подвійних агарових шарів та серійні пасажі для отримання відносно чистої лінії бактеріофагів. Обидві бактерії культивувались на твердому скошеному агаризованому середовищі LB 1,4% при 26-27 °C. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) було надано з колекції Лабораторії патофізіології рослин Інституту експериментальної ботаніки Академії наук Республіки Чехія. Бактерію культивували при 28 °C в середовищі LB, що містить 50 мкг/мл рифампіцину на чашках Петрі з 1.4% агаром або в закритих пробірках на ротаційному шейкері при 180 об/хв. Бактеріофаги до *Pst* було виділено зі зразків перцю із симптомами бактеріальної плямистості.

#### 3.2. Рослинний матеріал для експериментів з *P.syringae* pv. *tomato* DC3000

*Arabidopsis thaliana* Col-0 використовувався як дикий тип (WT); також в експериментах були використані мутантні рослини *A. thaliana* NahG, pPR1::GUS та pFRK1::GUS. Рослини вирощувалися на спеціальному субстраті та *in vitro*. Для всіх методик насіння стерилізували в 1.6% розчині гіпохлориду натрію (30% розчину SAVO ®, Unilever) з 0,02% TWEEN20 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Стратифікація протягом двох діб при 4°C в темних

умовах була застосована для виведення насіння зі стану спокою. Для підготовки рослин до інфільтрації насіння були висаджені в горщики з субстратними таблетками (Jiffy, Kristiansand, Норвегія) і вирощені в культиваторних камерах (Snijders, Drogenbos, Бельгія) при температурі 22 °С, вологості 65-70% і світловому режимі 10 год світло/14 год темрява. Через тиждень розсаду пересаджували по одній рослині в горщики. Для аналізу використовувалися чотиритижневі рослини. Для постановки флад-інокуляції 10 стерильних насінин були асептично розміщені на чашках Петрі з напівтвердим середовищем Murashige-Skoog 1/2, доповнені 10% сахарозою і культивувались протягом 14 днів при 22 °С та світловому періоді 10 год світло/14 год темрява. У випадку інокуляції в рідкому середовищі стерильне насіння висаджували в 24-лункові плашки (4-6 насінини на лунку), що містять 400 мкл рідкого середовища Murashige-Skoog з вітамінами, доповненими 10% сахарозою і культивували протягом 10 днів при 22 °С при світловому періоді 10 год світло/14 год темрява. На 7 день середовище було замінено на свіже.

### **3.3. Виділення та ідентифікація *Pantoea agglomerans***

Вміст цибулі з симптомами бактеріальної гнилі наносили на агаризоване середовище LB (складові: триптон – 10 г, екстракт дріжджів – 5 г, NaCl – 10 г, агар – 10 г, рН=7,5). Для визначення морфологічних особливостей бактеріальних колоній використовували метод світлової мікроскопії (Biomed MS-1 ZOOM). Тип дихання визначали після тесту на цитохромоксидазу в середовищі Хью-Лейфсона (головний розчин: пептон – 2; NaCl – 5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,3; агар – 3; 0,1% р-н бромтимолового синього – 3 мл; розчин з глюкозою: 10 г глюкози; 60 мл  $\text{H}_2\text{O}$ ). Додатково використовували селективні середовища: середовище Клігlera (ензиматично розщеплений казеїн – 10; ензиматично розщеплені тканини тварин – 10; лактоза – 10; декстроза – 1; ферум амоній цитрат – 0,5; NaCl – 5;  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  – 0,5; феноловий червоний – 0,025; агар – 15; рН = 7,2), середовище з уреазою (Крістенсена) (уреаза – 20;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 9,5;

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 9,1; екстракт дріжджів – 0,1; феноловий червоний – 0,01; pH=6,8), ТТХ (ензиматично розщеплений желатин – 10; NaCl – 5; м'ясний екстракт – 3; агар – 4; трифенілтетразоліум хлорид – 0,5; pH=7,3), Цитрат Сіммонса ( $\text{MgSO}_4$  – 0,2;  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  – 1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1; цитрат натрію – 2; NaCl – 5; бром тимоловий синій – 0,8; агар – 15; pH=6,8) та лізин декарбоксилаза (глюкоза – 1; L-лізин – 5; бромкресоловий фіолетовий – 0,016; pH=6,1). Також ідентифікацію проводили з використанням мікробіологічного аналізатора VITEC 2 compact (всеMérieux, Inc.), наборів для біохімічної ідентифікації мікроорганізмів Ентеротест-24, Нефермтест 24 (ErbaLachema) - згідно з інструкцією виробника. Бактеріологічний аналізатор Vitek-2 Compact (всеMerieux SA, Франція) дозволяє досліджувати одночасно до 30 проб за 46 диференційними тестами на одноразових картах для ідентифікації GN (Gram-negative identification card). Диференціація бактерій на карті GN заснована на стандартних біохімічних методах з використанням субстратів, що дозволяють оцінювати утилізацію вуглеводів і ферментативну активність.

Чутливість до антибіотиків встановлювали за допомогою дисків “HiMedia”. Для цього на чашках Петрі вирощували бактерію на середовищі Мюллера-Хінтона (М'ясний гідролізат – 300; гідролізат казеїна – 17,50; крохмаль – 1,50; агар – 17; pH=7,3), далі диски з відповідною концентрацією, просочені антибіотиком, поміщали на сформований бактеріальний газон. Результати встановлювали відповідно до діаметру сформованої зони інгібування навколо дисків згідно стандартам EUCAST (174).

### **3.4. Виділення бактеріофагів *P.agglomerans* та *S.marcescens***

Для виділення бактеріофагів були використані зразки стічних вод. Чисту лінію фагів отримували шляхом багаторазових пасажів окремих негативних колоній. Після кожного пасажу фаголізат обробляли та титрували методом агарових шарів. Для виділення чистої лінії бактеріофагу відбирали найбільш ізольовані бляшки на бактеріальному газоні та вирізували колонію носиком

мікропіпетки або бактеріальною петлею малого діаметру. Суспендували в невеликій кількості (200 мкл-1 мл) середовища. Висівали фаг методом подвійних агарових шарів. Далі в кожну чашку заливали 6 мл фізіологічного розчину та ставили в холодильник на 30 хв. Верхній агар обережно знімали та зливали разом з фізіологічним розчином. Отриману суспензію залишали на магнітній мішалці (1 година). Проводили низькошвидкісне центрифугування (5000 об/хв, 20 хв). В отриманий надосад додавали хлороформ в співвідношенні 1:4 та кілька разів струшували. Збирали верхню фазу та центрифугували (5000 об/хв, 20 хв). Отриманий надосад фільтрували із застосуванням бактеріального фільтра (Millex-GP Filter, 0.22  $\mu$ m, США).

### **3.5. Виділення бактеріофагів *P.syringae* pv. *tomato* DC3000**

Бактеріофаги були виділені з рослин перцю з симптомами бактеріозу, типовими для бактеріальної плямистості, індукованої *Pst* (174). Кількість бактеріофагів у зразках було збільшено методом збагачення (175,176). Тканину із симптомами мацерації перенесли в рідкий бульйон LB і інкубували протягом 48 годин при 28 °C без шейкера. Після інкубації LB бульйон центрифугували (5000 об/хв, 25 хв) і супернатант змішували з хлороформом 1:1 для видалення бактеріальних решток. Зразки були нанесені на бактеріальний газон методом подвійних агарових шарів (177). Окремі негативні колонії були відібрані і перенесені в стерильний розчин 0,9% NaCl (1 мл). Інфекційність ізольованих бактеріофагів була протестована на *Pst* методом спот-тесту; *Pst* була інкубована протягом ночі в рідкому середовищі LB при 27 °C і 180 об/хв (OD<sup>600</sup> (оптична щільність за довжини хвилі 600 нм) = 3-4). Потім 1 мл бактеріальної культури додали в 4 мл 0,7% LB м'якого агару (45°C) і вилили на чашки з LB агаром (обидва шари LB агару містять 50 мкг/мл рифампіцину). Чашки залишали висихати на 10 хвилин. Згодом 5 мкл лізату

фага ( $10^9$  БУО/мл) було додано на бактеріальний газон і інкубовано протягом ночі при 28 °С для формування зон лізису.

### **3.6. Очищення та накопичення бактеріофагів *P.agglomerans* та *S.marcescens***

Зразки були нанесені на бактеріальний газон методом подвійних агарових шарів. Окремі фагові колонії були відібрані і перенесені в стерильний фізіологічний розчин 0.9% NaCl (1 мл). Ізольовані бактеріофаги були очищені послідовним відбором негативних колоній фагів та їх ресуспендування в буфері. Для отримання фагів високого титру лізати готувалися з чашок з повним лізисом шляхом додавання 10 мл розчину 0.9% NaCl до 10 чашок. Верхній шар агару разом з буфером і фагами в ньому були відібрані після 30 хв. Лізати були очищені шляхом центрифугування 15000 об/хв протягом 15 хв.

### **3.7. Очищення та накопичення бактеріофагів *P.syringae* pv. *tomato* DC3000**

Фаги були накопичені і очищені відповідно до методу Бонілли (178). З чашки з негативними колоніями були відібрані поодинокі бляшки за допомогою стерильної бактеріальної петлі. Колонії були перенесені в мікроцентрифужну пробірку, що містила 1 мл SM буфера (5.8 г NaCl, 2.0 г  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 50 мл 1 М Tris-HCl pH 7.4, в 1 л  $dH_2O$ ) і витримували 5 хв на шейкері з низькою швидкістю обертання, потім центрифугували 4000 об/хв за 5 хв. За допомогою методу подвійних агарових шарів отримали чашки із повним лізисом. Приблизно 5 мл SM буфера заливали зверху на чашку і витримували 15 хв на повільному шейкері при кімнатній температурі. Буфер з чашок збирали і центрифугували по 4000 об/хв протягом 20 хв. Супернатант фільтрували через фільтр 0.22 мкм і додавали 0.1 об'єму хлороформу. Зразки були перемішані на вортексі і центрифуговані знову при 4000 об/хв протягом

5 хв, супернатант зберігався при 4 °С. Титр фагу був оцінений методом подвійних агарових шарів.

### 3.8. Електронна мікроскопія

Для дослідження морфології фагів *P.agglomerans* та *S.marcescens* фаговий лізат наносили на мідні сітки із заздалегідь готовим формваровим покриттям на дві хвилини, негативно контрастували в 2% розчині уранілацетата, рН 4 – 4.5. Сітки обережно просушували на фільтрувальному папері, а далі проглядали за допомогою трансмісивного електронного мікроскопу (JEOL 1400, інструментальне збільшення 40.000-90.000).

Для дослідження фагів *Pst* DC 3000 морфологія віріонів спостерігалася шляхом додавання невеликого об'єму концентрованих очищених віріонів ( $>10^9$ ) на сітки TEM з вуглецевим покриттям (Agar Scientific Ltd, Essex CM24 8GF Великобританія) і негативно забарвлених 2% уранілацетатом. Зразки були досліджені за допомогою електронного трансмісивного мікроскопа FEI (Morgagni).

### 3.9. Дослідження біологічних властивостей фагів

Діапазон інфекційності фагів був протестований методом спот-тесту і шляхом виявлення негативних колоній на чашках з газоном *P. syringae* pv. *tomato* (*Pst*). Динаміка адсорбції фагів була оцінена за раніше описаною методикою (6). 18-годинна (нічна) культура *Pst* DC3000 в рідкому LB середовищі з 1 мг/мл рифампіцину була розбавлена до значень  $OD^{600} = 0.4$  (відповідність концентрацій *Pst* до значень  $OD^{600}$  вказана у таблиці 3.1. (179)) і інокульована фагами за множинності інфекції (MOI) 0.001. Значення MOI розраховувались як відношення фагового титру у зразку до бактеріальної концентрації з урахуванням об'єму обох:

$$\frac{\text{бажаний показник MOI} * \text{кількість КУО/мл}}{\text{БУО/мл}}$$

Чим більше значення MOI, тим більший відсоток бактеріальних клітин буде інфікований фагами. Одразу після змішування, 100 мкл суспензії переноситься в 2-мл мікроцентрифужні пробірки, що містять 850 мкл LB середовища з 50 мкл  $\text{CHCl}_3$ . Цей етап повторювався щохвилини: із початкової суспензії відбирали 100 мкл і вносили у наступні пробірки із позначенням часу. Потім суміш струшували протягом 10 хвилин, щоб видалити бактеріальні рештки. Супернатант був серійно розведений (1:10), а кількість неадсорбованих фагів оцінювали методом подвійних агарових шарів. Константа адсорбції була обчислена відповідно до методу, описаного Ромбоуцем (40) за формулою:  $[k = (2.3/(B \times t)) \times \log(P_0/P)]$ , де B - бактеріальний титр на початку, P - фаговий титр і t - час].

Таблиця 3.1. Відношення значень  $OD^{600}$  до концентрації бактерій

<b><math>OD^{600}</math></b>	<b>КУО/мл</b>
0	0
0.00002	$1 \times 10^4$
0.0001	$5 \times 10^4$
0.0002	$1 \times 10^5$
0.001	$5 \times 10^5$
0.002	$1 \times 10^6$
0.01	$5 \times 10^6$
0.02	$1 \times 10^7$
0.05	$3 \times 10^7$
0.1	$5 \times 10^7$
0.2	$1 \times 10^8$
0.5	$3 \times 10^8$
1	$5 \times 10^8$

Термічна та рН-стійкість фагів була перевірена шляхом інкубації фагової суспензії  $10^9$  БУО/мл в SM-буфері за різних температур (від -20 до 50°C) та в рН-буфері від 1 до 13 (SM-буфер з NaOH або HCl) протягом 6 та 24 годин та обчислювали титр.

Криві динаміки лізису для фагів були отримані після інокуляції культури *Pst* DC3000 ( $OD^{600} = 0.1$ ) фагами Eir4 і Eisa9 при MOI 0,1 і 0,01. Суміші *Pst* з фагами, бактеріальний і фаговий контроль були підготовлені в прозорих 96-лункових планшетах і інкубовані при 26 °C протягом 5 годин на спектрофотометрі (TECANInfinite ® 200 PRO), адсорбція при  $\beta = 600$  нм вимірювалася кожні 60 хв.

Частота бактеріальної резистентності була визначена методом подвійних агарових шарів (40). Фаг і бактерії були інкубовані за значень MOI 10, щоб отримати повний лізис на чашках. Після 72 годин інкубації, нові колонії були підраховані, і чотири незалежні колонії (по дві на кожен фаг) були культивовані і перевірені на резистентність до обох фагів. Частота виникнення мутантів, стійких до фагів, розраховувалася шляхом ділення кількості стійких бактерій на загальну кількість чутливих бактерій.

### **3.10. Методи інокуляції рослин**

#### **3.10.1. Інокуляція картопляних дисків**

Для перевірки фітопатогенних властивостей бактерій та активності проти них виділених бактеріофагів використовували диски картоплі. Здорові, без механічних ушкоджень картоплини очистили від шкірки і обтерли 96% спиртом, обпалили над полум'ям пальника. Розрізали картоплини на шматочки діаметром 3-4 см, товщиною 0,5 см і розклали на чашки Петрі на попередньо зволожений дистиллятом фільтрувальний папір. Інфікування проводили шляхом нанесення 1 мл завису бактерій з нічної культури петлею у

випадку бактеріального контролю та суміш 1:1 бактерії та лізату фага. Помістили в термостат при 25°C (180).

### **3.10.2. Інокуляція цибулин *Allium sera***

В лусочці цибулі стерильним скальпелем робили надрізи 2-3 см і розкладали на попередньо зволожений дистиллятом фільтрувальний папір в стерильних чашках Петрі. В контрольній лусочці на місці надрізів наносили 0.9% NaCl, в дослідних — нічну культуру бактерії та суміш культури бактерії та бактеріофага за значень MOI 10. Помістили в термостат при 25°C (44).

### **3.10.3. Флад-інокуляція**

Рослини *A.thaliana*, вирощені на твердому середовищі, були інокульовані методом флад-інокуляції (181). Стратифіковане стерильне насіння (n = 9-10 на пластину) культивували на твердому MS 1/2 середовищі (2,2 г середовища Murashige & Skoog (Duchefa, Нідерланди), 10 г сахарози, 8 г агаризованого середовища для рослин (Duchefa, Нідерланди) на 1 л, доведено до рН 5.7 з використанням 1 М КОН). Розсаду вирощували в чашках Петрі протягом 12-14 днів при тривалому фотоперіоді (16 г/8 г світлого/темного режиму) при 22 °С. На 14 день чашки були залиті суспензією нічної культури *Pst* DC3000 розведеною в 10 мМ буфері MgCl<sub>2</sub> (OD<sup>600</sup> = 0.01) із додаванням 6.25 мкл Silwet L-77 та змішаній в 50 мл суспензії протягом 2-3 хв з фагом при MOI = 50; для контролю частина рослин була залита фаговою суспензією, частина - тільки буфером. Зразки були зібрані в день інокуляції, 1 і 2 день після інокуляції. Один зразок містив в собі розетки 2-3 рослин (коріння були відрізані ножицями). Тканини гомогенізували в 2 мл мікроцентрифужних пробірках, що містили 1 г керамічних кульок 1,3 мм діаметром, за допомогою гомогенізатора FastPrep-24 (MP Biomedicals, США). Отриманий гомогенат був

серійно розведений в 10 мМ MgCl<sub>2</sub> і розтитрований на чашках із середовищем LB з додаванням рифампіцину. Колонії були підраховані після 1-2 днів інкубації при 28 °С.

#### 3.10.4. Інокуляція в рідкому середовищі

Рослини вирощували в рідкому середовищі MS (4.41 г Murashige & Skoog з вітамінами (Duchefa, Нідерланди), 5 г сахарози, 5 г моногідрату MES (Duchefa, Нідерланди), рН 5.7). Поверхнево-стерилізоване насіння вносили у 24-лункові планшети в 400 мкл рідкого середовища MS на лунку (по 4-5 насінин) і культивували протягом 10 днів при короткоденному фотоперіоді (10 г/14 г світлого/темного режиму) при 22°C. На 7-й день середовище замінювали на свіже. На 11-й день проводили інокуляцію шляхом заміни середовища бактеріальною суспензією *Pst* DC3000 в 10 мМ MgCl<sub>2</sub> (OD<sup>600</sup> = 0.01), сумішшю бактерій і фагів (MOI = 2, 10, 50), або тільки з фагом (10<sup>9</sup> БУО/мл). Через 1 хв інкубації суспензії замінили свіжим середовищем MS. На 12 день зразки були зважені і зібрані в 2 мл мікроцентрифужні пробірки із керамічними кульками для гомогенізації. Наступні етапи аналогічні таким як у методі флад-інокуляції.

#### 3.10.5. Інфільтрація

Поверхнево-стерилізоване насіння *A. thaliana* висівали в торф'яних гранулах Jiffy 7, а рослини вирощували у режимі короткого дня (світлий/темний режим 10 год/14 год) при температурі 22°C і відносній вологості 70%. Всі рослини поливали тільки дистильованою водою. Для інокуляції нічну культуру *Pst* DC3000 на твердому середовищі LB змивали в 10 мМ буфері MgCl<sub>2</sub> і розводили до OD<sup>600</sup> = 0.001. Бактеріальна суспензія попередньо змішувалась з фаговою суспензією при MOI 3-4 і відразу ж

інокулювалась в листки за допомогою шприця без голки (по три листка на рослину). На 2 день після інокуляції з листків були вирізані та зібрані диски (по одному диску на лист, діаметром 0.6 см); три листові диски з однієї рослини були об'єднані в один зразок. Наступні етапи аналогічні таким як у методі флад-інокуляції.

### 3.10.6. GUS-гістохімічний аналіз

Для GUS-гістохімічного аналізу ми використовували лінії *A. thaliana*, що мають в собі pFRK1::GUS та pPR1::GUS конструкції: 11-денні саджанці в рідкому середовищі та 4-тижневі рослини для інфільтрації. Інфільтровані листя або оброблені саджанці були перенесені в GUS-розчин (2 мМ X-GLUC, 50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> рН 7, 0.5% (v/v) Тритон-Х, 0.5 мМ К-феріціанід) на 16 годин при 37°C (182). Потім листя обробляли в льодяній оцтовій кислоті (3:1 v/v), а далі знебарвлювали в різних концентраціях спирту (70%, 50%, 30%, dH<sub>2</sub>O, не менше 1 години в кожному розчині). Листки були відскановані за допомогою Epson Perfection V700 Photo (Suwa, Японія), а відсоток забарвлення був порахований за допомогою програмного забезпечення FiJi (183).

### 3.11. Робота з фагорезистентними штамми

Чотири ізольовані колонії *Pst*, названі Res1, Res2, Res3 і Res4, були зібрані з чашок із повним лізисом, які були інкубовані протягом 48 годин при 26 °С. Стійкість до бактеріофагів Eir4 підтверджена методом спот-тесту. Для дослідження характеристик росту ізольованих стійких штамів *in vitro* рідкі культури в середовищі LB (з рифампіцином) були підготовлені в прозорій 96-лунковому планшеті і інкубовані при 26 °С протягом 72 годин на спектрофотометрі (TECAN Infinite ® 200 PRO), адсорбція при  $\beta = 600$  нм вимірювалася щогодини. Для дослідження росту *in planta* 4-тижневі рослини

*A.thaliana* інфільтрували суспензіями Res1, Res2, Res3, Res4 і *Pst* в 10 мМ MgCl<sub>2</sub> (OD<sup>600</sup> = 0.001). На другий день після інокуляції були зібрані зрізані листові диски (по одному диску на листок, діаметром 0.6 см); три листові диски з однієї рослини були об'єднані в один зразок. Подальша обробка та урахування результатів виконувались аналогічно до попередніх методик.

### **3.12. Підготовка бактеріофагів до секвенування методом Ion Torrent**

З метою накопичення зразку бактеріофагу висівали методом подвійних агарових шарів. Далі в кожену чашку заливали 10 мл фізіологічного розчину та ставили в холодильник на 24 год. Верхній агар обережно знімали та зливали разом з фізіологічним розчином. Отриману суспензію залишали на магнітній мішалці (20 хв). Проводили низькошвидкісне центрифугування (5000 об/хв, 20 хв). Надосад відбирали та фільтрували крізь бактеріальний фільтр.

Надалі проводили високошвидкісне центрифугування (29 тис об/хв). Після цього над осад зливали, осад ресуспендували в 1 мл фіз. розчину та змив повторно центрифугували при 5000 об/хв, 20 хв. Повторно пропускали крізь бактеріальний фільтр. Додаткове очищення отриманого бактеріофагу проводили центрифугуючи в градієнті CsCl з подальшим висолюванням використовуючи стандартну методику (184). Виділення ДНК зразку бактеріофагу проводили з використанням набору “ДНК-сорб-С-М” згідно стандартного протоколу. З метою перевірки чистоти виділеної ДНК використовували спектрофотометр NanoDropND 1000 (США) відповідно до протоколу виробника (185). Для очищення та концентрації отриманого ДНК продукту використовували набір Zymo research DNA Clean & Concentrator (США). Для вимірювання концентрації отриманого продукту використовували набір Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) та прилад спектрофотометр Qubit 2.0 (Invitrogen, США). Метод заснований на тому, що спектрофотометр Qubit використовує специфічні

флуоресцентні фарби для визначення концентрації нуклеїнових кислот або білків в зразку. Спектрофотометр використовує УФ-поглинання для визначення природнього поглинання світла при 260 нм (для ДНК та РНК) та 280 нм (білки).

### **3.13. Підготовка бібліотеки зразків**

Для підготовки бібліотеки зразків попередньо виконали заміри концентрації ДНК у зразку за допомогою спектрофотометра Qubit. Власне етап підготовки бібліотеки починається з етапу т.з сонікації зразку, тобто неспецифічного розщеплення ДНК зразку на фрагменти по 300 пн.

На сьогодні існує три основні підходи для проведення фрагментації нуклеїнових кислот: фізичний, ензиматичний і хімічний. Фрагментація ДНК зазвичай проводиться фізичними методами (сонікація та акустична фрагментація) або ензиматичними методами (наприклад неспецифічна суміш ендонуклеаз або реакції транспозаз). В нашому випадку для отримання ДНК фрагментів довжиною 300 пн використовувався фізичний метод на приладі Covaris instrument (Covaris, США)(186).

Процедуру фрагментації виконували відповідно до стандартної методики. Після завершення етапу фрагментації 2 мкл аліквоти відбирається для перевірки якості фрагментування зразків на біоаналізаторі. Результати отриманих даних аналізували використовуючи програмне забезпечення NanoDrop software (доступна для Microsoft Windows XP).

Контроль якості фрагментованої ДНК проводили за допомогою приладу Agilent Bioanalyzer 2100 (США) та Agilent High Sensitivity DNA kit (США). Для цього 2 мкл зразку відбирали та вносили на чіп разом з ДНК маркерами, для визначення розміру та кількості утворених фрагментів. Процедуру виконували відповідно до протоколу наданого виробником.

Для подальшої процедури підготовки зразку до секвенування використовували набір Ion Plus Fragment Library Kit (Thermo Fischer Scientific, США).

Основні процедури, що включали підготовку зразку на даному етапі це:

- 1) відновлення кінців фрагментів, очистка за допомогою магнітних бідсів;
- 2) лігування адаптерів до фрагментів та баркодів, повторна очистка за допомогою бідсів, застосування термоциклера (Thermal cycler, США) для встановлення необхідних температурних та оптимальних режимів роботи зазначених ензимів;
- 3) Ампліфікація бібліотеки, тобто приготування необхідної ПЛР суміші та застосування термоциклера (Thermal cycler, США) для встановлення необхідних температурних та оптимальних режимів роботи зазначених ензимів та проходження реакцій;
- 4) Повторна очистка за допомогою бідсів та елюція ТЕ буфером.

Після проведених етапів контроль якості фрагментованої ДНК повторно виконували за допомогою Agilent Bioanalyzer 2100 (США) та Agilent High Sensitivity DNA kit (США). Система Ion OneTouch 2 (Thermo Fischer Scientific, США) складається з двох компонентів або модулів: Ion OneTouch 2 Instrument (Thermo Fischer Scientific, США) та Ion OneTouch ES (система насичення) (Thermo Fischer Scientific, США). Надалі для приготування позитивно заряджених Ion Sphere Particles (ISPs), що містять клонально ампліфіковану ДНК використовували Ion OneTouch™ 2 Instrument (Thermo Fischer Scientific, США). Для проведення підготовки зразку до емульсійної ПЛР в даному приладі використовували Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 Kit (Thermo Fischer Scientific, США) відповідно до стандартного протоколу виробника. Основний принцип першого модуля полягає в тому, що він містить реакційний фільтр, в якому відбувається клональна ампліфікація, тобто попередньо потрапляє біотинильований фрагмент ДНК, що прикріплюється до стрептавідинової

сфери та розмножується. В результаті кожна сфера буде містити один фрагмент ДНК в помноженій кількості. Крім того, в першому модулі є термоциклер, що встановлює оптимальні умови для протікання реакції. Другий модуль системи це прилад Ion OneTouch™ ES (Thermo Fischer Scientific, США), разом з яким використовували Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 Kit (Thermo Fischer Scientific, США) [85]. Суть даного етапу полягає в тому, що модуль містить центрифугу, що дозволяє збирати сфери з зв'язаною ДНК та відділити їх від порожніх сфер. З метою перевірки якості отриманих сфер з ДНК використовували спектрофотометр Qubit 2.0 (Invitrogen, США) та Ion Sphere™ Assay on the Qubit™ 2.0 Fluorometer User Guide (Thermo Fischer Scientific, США) відповідно до стандартного протоколу [86]. Основний принцип полягає в тому, що ISPs мітять двома флуорофорами DZ Alexa Fluor™ 488 та Alexa Fluor™ 647. Флуорофор Alexa Fluor™ 488 приєднується абсолютно до всіх сфер, що присутні у зразку. На противагу, Alexa Fluor™ 647 приєднується до сфер, на яких прикріплені ДНК. В результаті підрахований показник флуоресценції Alexa Fluor™ 647 (сфери з ДНК) відносно Alexa Fluor™ 488 (всі сфери) відображує % зв'язаних сфер.

### 3.14. Секвенування бактеріофагів *S.marcescens*

На спеціальний чіп з великою кількістю мікролунок вноситься зразок, з етапами відмивки, рівномірно розподіляється зразок та потім завантажується у секвенатор. Основний принцип секвенування за технологією Ion Torrent - це реєстрація зміни рН в лунках. Коротко, процес відбувається наступним чином:

- 1) в кожній лунці мікрочіпа міститься сфера з ДНК, під ним металооксидний шар, сенсорна тарілка, електронні компоненти;
- 2) в процесі проходження кожного циклу до лунки надходять 4 види дезоксирибонуклеотид трифосфатів (А,Т,Г,Ц), що в подальшому або інкорпорується або не інкорпорується в зростаючий ланцюг ;

- 3) у випадку якщо відбулась інкорпорація в зростаючий ланцюг певного нуклеотида, вивільнюється протон  $H^+$ , через що рН змінюється, та виникає хімічний сигнал;
- 4) сенсор переводить хімічний сигнал в цифровий, що викликає зміну поверхневого потенціалу металооксидного шару та електродного витоку польового транзистора;
- 5) надалі цифровий сигнал фіксується приладом.

Встановлений сервер Ion PGM зберігає дані, які потім зберігаються на комп'ютері. В нашому випадку ми використовували Ion PI™ Chip (Thermo Fischer Scientific, США), Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit та Ion PI™ Chip Kit v3 (Thermo Fischer Scientific, США) відповідно стандартної процедури. Для секвенування застосовували прилад Ion Proton™ (Thermo Fischer Scientific, США).

### 3.15. Обробка отриманих даних

Для вирішення питання про значимість вибіркового показника та оцінки вірогідних відмінностей між одержаними показниками результати були оброблені статистичним методом. Статистична обробка даних, отриманих при роботі з фагами та бактеріями, проводилась з урахуванням стандартного відхилення:

$$E = \bar{E} \pm \sigma$$

$$\bar{E} = (E_1 + E_2 + \dots + E_i) / i$$

$$\Sigma = |E_{\max} - \bar{E}| = |E_{\min} - \bar{E}|,$$

де  $\bar{E}$  – достовірне значення екстинкції;  $E$  – середнє арифметичне виміряних значень екстинкції  $E_1 \dots E_i$ ;  $\sigma$  – стандартне відхилення.

Для визначення величин, виражених у відсотках, визначали середню похибку відсоткового відношення за формулою:

$$mp = \sqrt{P(100-P)} \% /n,$$

де  $m$  - середня похибка в %;  $P$  - одержана частота ознаки, що вивчається у %;  $n$  - число спостережень у даному досліді. Середнє арифметичне значення розраховували за формулою:

$$X_{\text{ср}} = \frac{x_1+x_2+x_3+\dots+x_n}{n} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Статистичну обробку даних в експериментах з групами рослин проводили за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (one-way ANOVA) з урахуванням методу Тьюкі (187) та використанням інструментів Microsoft Excel.

Програмне забезпечення FastQ використовували для перевірки контролю якості отриманих сиквенсів. Програмне забезпечення Trimmomatic та BBNorm використовували для прибирання помилок та просеквенованих адаптерів. Програмні забезпечення MIRA (Mimicking Intelligent Read Assembly) та SPAdes (St. Petersburg genome assembler) використовували для збирання отриманих послідовностей у форматі FASTQ. Для анотації геному та пошуку відкритих рамок зчитування і переведення послідовності в амінокислотну здійснювали за допомогою DNA Master, що має вбудований BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), а саме BLASTp, при цьому стандартні параметри пошуку не змінювали. За допомогою програми SerialCloner побудували циркулярну графічну карту для візуалізації послідовності. Також ми використовували цю програму для пошуку відкритих рамок зчитування. Програму ClustalW використовували для множинного вирівнювання послідовностей та програму MEGAX - для філогенетичного аналізу (Neighbor-Joining method, 1000 бутстреп реплікацій).

## РОЗДІЛ 4

### ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІЙ *PANTOEA AGGLOMERANS*, *SERRATIA MARCESCENS* ТА *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *TOMATO* ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХ БАКТЕРІОФАГІВ

#### 4.1. Ідентифікація збудника фітобактеріозу цибулі

Ізолят бактерії було виділено з плоду цибулі з симптомами бактеріальної гнилі. На першому етапі ми проводили морфологічний аналіз виділеної бактерії. Нововиділений ізолят формував жовті, круглі, блискучі, мукоїдного типу колонії. Надалі проводили біохімічну характеристику бактерії із використанням селективних середовищ Хью-Лейфсона, Клігlera, сечовини за Крістенсенем, ТТХ (трифенілтетразолію хлорид), цитрата Сіммонса. В таблиці 4.1. представлено результати реакції бактерії на названі середовища, за якими можна було зробити попередні висновки про нововиділену бактерію: це факультативний анаероб, здатний ферментувати глюкозу до кислоти і газу, без виділення сірководню; не продукує уреазу – уреазний тест був негативним; тест на рухливість був оцінений як негативний, в напіврідкому середовищі ТТХ бактерія рухалась повільно; ізолят здатний утилізувати цитрат. Попередньо за зазначеними вище характеристиками бактерію ідентифікували як представника родини *Enterobacteriaceae*. Далі, за допомогою тест-систем продовжили біохімічну характеристику бактерії (таблиця 4.2.).

Таблиця 4.1. Біохімічна характеристика бактерії (селективні середовища)

Біохімічний маркер	Середовище Хью-Лейфсона	Середовище Клігlera	Сечовина за Крістенсенем	ТТХ	Цитрат Сіммонса
Результат	Факультативний анаероб	Лактоза+ Глюкоза + Газ H <sub>2</sub> S -	Уреаза -	+/-	Цитрат +

Таблиця 4.2. Біохімічна характеристика бактерії (біохімічні тести)

<b>Ознака/ маркер</b>	<b>Наявність ознаки у бактерії</b>
Утворення нерозчинних пігментів	+
Гідроліз желатину	-
Продукція індолу	-
Утворення H <sub>2</sub> S	-
Редукція нітратів	+
Цитрат	+
Малонат	+
Ферментація сукцината	+
Малат	-
Орнітин-декарбоксилаза	-
Лізин-декарбоксилаза	-
Декарбоксилаза лужна	-
Альфа-галактозидаза	-
Бета-галактозидаза	+
Альфа-глюкозидаза	-
Бета-глюкозидаза	-
Бета-ксилозидаза	-
Фенілаланіндезаміназа	-
Гліцин-аріламідаса	-
Бета-аланін-аріламідаса	-
L-пролінаріламідаса	-
Бета-N-ацелілглюкозамідаса	-
L-піролідоніл-аріламідаса	+
Тирозинаріламідаса	-
Гамма-глутаміл-трансфераза	+

**Продовження таблиці 4.2.**

Фосфатаза	+
Ліпаза	-
Уреаза	+
Тагатоza (галактулоза)	-
Арабіноза	+
Ксилоза	+
Глюкоза	+
Ферментація/глюкоза	+
Реакція Фогес-Проскауера	+
Лактоза (ферментація)	+
Сахароза	+
Палатіноза (ізомальтулоза)	-
Мальтоза	-
Трегалоза	+
Манноза	+
Целлобіоза	-
Раффіноза	-
Адонітол	-
Арабітол	+
Маннітол	+
Сорбітол	-
Дульцитол	-
Инозітол	-
Саліцин	+
Гидроліз ескуліна	+
Асиміляція L-лактата	-
Зброджування L-лактата	+

Відповідно до отриманих результатів та після аналізу співпадінь з біохімічними тестами з літературних даних (188), виділений ізолят ідентифікували як *Pantoea agglomerans*.

Чутливість до антибіотиків встановлювали за допомогою дисків «HiMedia». Результати встановлювали згідно стандартам EUCAST. Чутливість бактерії до антибіотиків представлено в таблиці 4.3.

Таблиця 4.3. Чутливість виділеної *P. agglomerans* до антибіотиків

Назва антибіотику	Зона затримки росту, мм	Інтерпретація результатів
Амікацин	20	Ч
Ампіцилін	20	Ч
Амоксиклав	14	Ч
Цефалексин	14	Р
Цефаклор	16	Ч
Цефотаксим	21	Р
Цефтазідім	20	Р
Ципрофлоксацин	24	Р
Хлорамфенікол	20	Р
Цефуроксім	16	Р
Гентаміцин	19	Ч
Норфлоксацин	12	Р
Левовфлоксацин	20	Ч
Нітрофурантоїн	17	Ч
Моксіфлоксацин	27	Ч
Нетілміцин	18	Ч
Амікацин	20	Ч
Ампіцилін	20	Ч

Примітка до табл. Р – резистентність; Ч – чутливість

Перевірка отриманої бактерії щодо резистентності до антибіотиків дозволила встановити резистентність до Цефалексину, Цефотаксиму, Цефтазідіма, Ципрофлоксацина, Хлорамфенікола, Цефуроксіма, Норфлоксацина (загалом резистентність виявлена до сполук бета-лактамового ряду).

Слід зазначити, що серед багатьох видів фітопатогенних бактерій подібні морфологічні особливості мають бактерії родин *Xanthomonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*. Здатність зброджувати і окислювати глюкозу в середовищах із зниженим рівнем кисню свідчить про те, що досліджувані бактерії можуть жити у глибоких шарах ґрунту, де імовірно, вони опиняються після оранки. Це, в свою чергу, дозволяє припустити значну екологічну пластичність досліджуваних фітопатогенних бактерій і здатність їх уникати агротехнологічного способу боротьби з бактеріями, такими, як оранка.

Отже, із томатів з симптомами бактеріозу нами було виділено і визначено бактерію *P.agglomerans*, яка відноситься до так званих полібіотрофних бактерій, які можуть інфікувати рослинні клітини і в той же час викликати опортуністичні інфекції у людей. Пошук бактеріофагів до цієї бактерії є важливим не лише в контексті захисту рослин, але і медичної фаготерапії.

#### **4.2. Характеристика бактеріофага *P.agglomerans***

Бактеріофаг до ідентифікованої бактерії *P.agglomerans* було виділено зі зразку стічних вод, наданих Бортницькою станцією аерації у місті Києві. Бактеріофаг демонстрував чіткі зони лізису при перевірці його специфічності до даної бактерії методом спот-тесту. З метою вивчення морфологічних характеристик бактеріофагів використовували метод електронної мікроскопії. Серед морфологічних характеристик бактеріофаг специфічний до *P.agglomerans* мав ікосаедричну головку 95 нм та хвіст 120 нм в діаметрі. Такі морфологічні характеристики мають міоподібні бактеріофаги (рис. 4.1.):

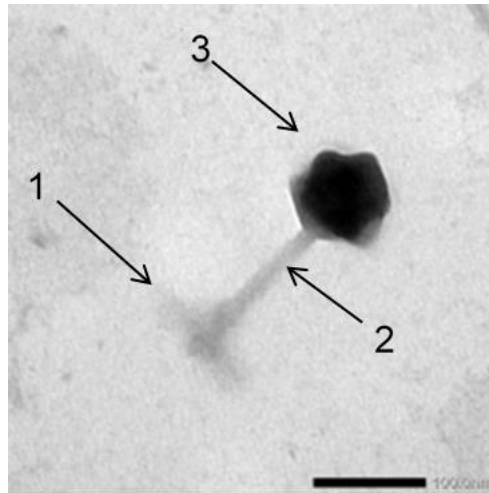


Рис. 4.1. Морфологія бактеріофагу Eh1: морфотип A1, капсид 95 нм, хвостовий відросток 120 нм (бар 100 нм); 1 – базальна пластинка, 2 – хвостовий відросток, 3 – капсид.

Бактеріофаг, що отримав робочу назву Eh1, випускає невеликі бляшки,  $d < 1$  мм (рис. 4.2.). Після послідовного розмноження бактеріофаги формують негативні колонії на бактеріальних тестових культурах без зменшення фагових титрів, що свідчить про літичний цикл вірусного розмноження і, крім того, є незамінною умовою для розробки фагових продуктів.

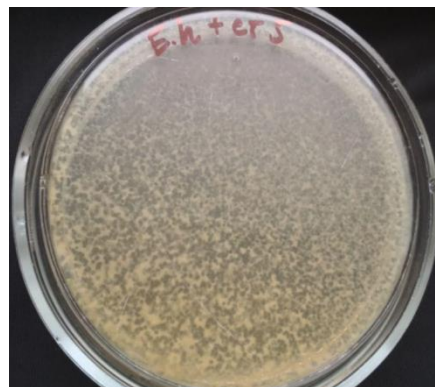


Рис. 4.2. Негативні колонії ізоляту Eh1 на газоні *P. agglomerans*

Для дослідження того, чи здатний ізольований Eh1 пригнічувати бактеріальну інфекцію *in vitro*, був використаний знову метод шматочків картоплі. В результаті бактеріальний ріст на кубиках картоплі був успішно пригнічений бактеріофагом (рис.4.3.):



A)

Б)

В)

Рис. 4.3. Вплив фага Eh1 на перебіг інфекції, викликаной *P.agglomerans*: інокуляція бактерією (Б) та сумішшю бактерії і ізоляту Eh1 (В). А – контроль (0.9% NaCl)

Шматочки картоплі, інокульовані сумішшю бактеріофага та бактерії не мали видимих симптомів бактеріозу: була відсутня мацерація тканин, потемніння, утворення бактеріального слизу на поверхні.

Отже, виділений нами бактеріофаг відносився до типових представників міоподібних вірусів, що серед відомих і досліджених фагів бактерій роду *Pantoea* описано вперше, оскільки відомі фаги здебільшого мають морфологію сіфоподібних фагів. Також, вірус продемонстрував ефективність проти *P.agglomerans* в попередженні викликаного нею бактеріозу на поверхні механічно пошкодженої рослинної тканини.

#### 4.3. Характеристика бактеріофагів *S.marcescens*

Виділений зі стічних вод фаг *Serratia* 4S утворював прозорі бляшки ( $\approx 2$  мм в діаметрі) на МПА агарі (рис.4.5.), інокульованому *Serratia marcescens*, штамом ІМВГ291. Тому на наступному етапі були отримані електронні зображення фагів. Фаг *Serratia* 4S мав ікосаедричну голову (близько 68 нм в діаметрі) і довгий скорочений хвіст (близько 107 нм в довжину і 18 нм в діаметрі). Морфотип А2 є типовим для міоподібних вірусів (рис. 4.4.).

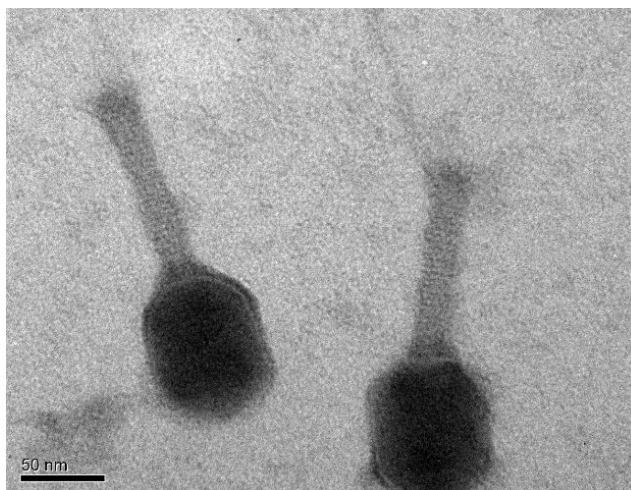


Рис. 4.4. Морфологія бактеріофага 4S: морфотип А2, капсид 68 нм, хвостовий відросток 107 нм. Бар 50 нм.

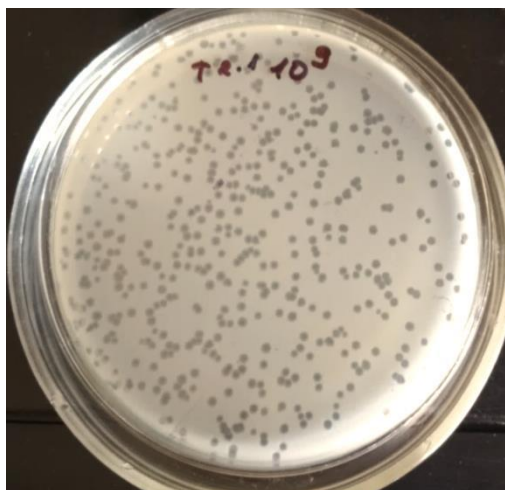


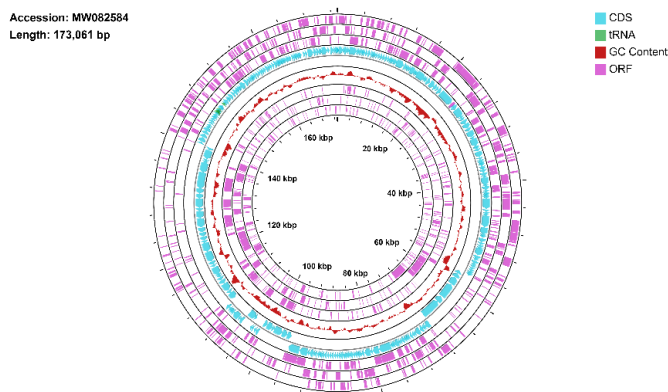
Рис. 4.5. Негативні колонії фага 4S на газоні *S.marcescens*

Згодом, бактеріофаг був секвенований за методом повногеномного секвенування (WGS). Дані послідовності ДНК були додатково піддані генетичному аналізу. Геном 4S *Serratia* phage являє собою 173, 061-bp дволанцюгову ДНК з вмістом GC пар 39,9%. Результати Blastn показали, що найближчий до *Serratia* phage 4S фаг - це *Serratia* phage CBH8 (7% охоплення запиту, 76% ідентичності). Загальна кількість послідовностей кодування (CDS) фага 4S склала 290. Геном *Serratia* phage 4S містить гени, які можуть бути згруповані за своєю функцією: структурні та гени для реплікації/рекомбінації/репарації, транскрипції, трансляції, метаболізму

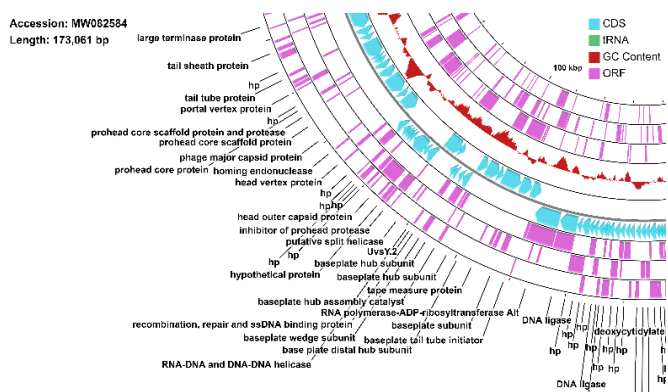
нуклеотидів та додаткових функцій. Перша група, що включає структурні гени фагів, кодує білки структури голови (головний капсидний білок, prohead protease та основні білки, риштування та білки доповнення голови), а друга - білки структури хвоста/шиї (білки хвостової трубки та оболонки, стабілізатор хвостової оболонки та білки доповнення, білок хвостового волокна, білки шиї). Отже, перша і друга групи фагів кодують білки, які дозволяють повністю відновити структуру голови і хвоста. Третя група генів реплікації/рекомбінації/репарації кодує реплікаційні білки (Білок гПА, субодиниці ДНК топоізомерази II, ДНК-лігаза, субодиниця ДНК-примаза-геліказа, гелікази ДНК та примаза, субодиниця фазного затискача, білок зсувного затиску, ДНК-полімераза та екзонуклеаза A, протекторний білок ДНК та ендонуклеази) і рекомбінації/відновлення білків (рекомбінація ендонуклеаз, відновлення та одноланцюгового ДНК-зв'язуючого білка), що передбачає фагові 4S мають власні системи реплікації/рекомбінації/репарації. Четверта група генів метаболізму нуклеотидів кодує дезоксицитидилат-деамінази, тимідилатсинтази та кінази, а також редуктази. П'ята група генів транскрипції/транскрипції кодує фактор сигми РНК-полімерази для пізньої транскрипції, транскрипційний білок та трансляційний білок-репресор. Додаткові гени кодують білки, такі як лізоцим, який допомагає фагам лізувати клітину господаря, таким чином вивільняються фагові віріони. Серед усіх передбачених кодуючих послідовностей в геномі фага 4S для філогенетичного аналізу були використані головний капсидний білок і ДНК-геліказа. *Serratia phage 4S* був доданий до бази даних GenBank під номером доступу MW082584.

Карта геному фага була побудована за допомогою CGView Server (рис. 4.6.). Кількість ORF (по старт-кодону ATG) – 357. Концентричні кільця відображають інформацію про гени залежно від послідовності фагової ДНК. Збільшена карта являє собою частину геному *Serratia phage 4S*, який в основному включає в себе гени, які кодують структурні білки, такі як білки

хвоста і білки хвостової трубки, portal vertex-білок, prohead-білки, основний капсидний білок, інгібітор prohead-протеази, зовнішній капсидний білок, білок tape measure, baseplate hub assembly catalyst-білок, субодиниці білків базальної пластинки, білок-ініціатор хвостової трубки. Збільшена мапа також представляє гени, які кодують реплікацію/рекомбінацію/репарацію білків, включаючи гомінінг-ендонуклеазу, потенційну спліт-геліказу, РНК-полімеразу-АДП-рибосилтрансферазу Alt, рекомбінацію, репарацію та олдДНК-зв'язуючий білок, РНК-ДНК та ДНК-геліказу ДНК. Гіпотетичні білки позначаються як hp.



А)



Б)

**Рис. 4.6.** Карта геному *Serratia* phage 4S, генерована за допомогою CGView Server, відображається весь геном (А) і збільшена карта (Б). Зміст кілець (починаючи з зовнішнього кільця) такий: кільця 1, 2, 3, 6, 7, і 8 зображують ORF; Кільце 4 показує потенційні послідовності кодування (CDS); Кільце 5

показує вміст GC-пар. Мітки вказують на функції білків, закодованих потенційними послідовностями кодування (Б).

Філогенетичні дерева були побудовані на основі збережених послідовностей *Serratia* phage 4S. Перше філогенетичне дерево було побудовано з використанням амінокислотних послідовностей передбачуваного головного капсидного білка (MCP), який часто є найбільш збереженою послідовністю в геномах фагів. Згідно з філогенетичним аналізом *Serratia* phage 4S MCP, результати показали, що його MCP був дуже гомологічним для *Acinetobacter* і *Enterobacter* фагів, і навпаки віддаленим від MCP фагів *Klebsiella* (рис. 4.7.).

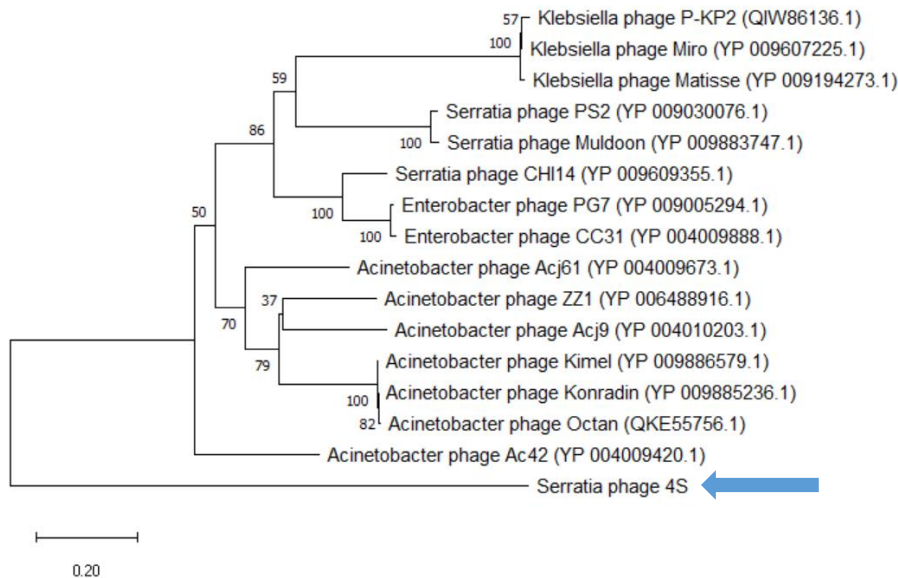


Рис. 4.7. Порівняльний філогенетичний аналіз основного капсидного білка *Serratia* phage 4S з білками виділених фагів у NCBI-BLAST. Філогенетичні дерева були побудовані з використанням вирівнювання ClustalX і методу neighbor-joining в MegaX. Ідентифікатор білка показаний після назви кожного фага в дужках. Суцільна стрілка вказує на розташування *Serratia* phage 4S. Кількість бустреп-реплікацій вказуються на вузлах. Амінокислотні заміни на ділянку вказуються в межах шкали.

Друге філогенетичне дерево було побудовано з використанням амінокислотних послідовностей передбаченої гелікази ДНК. Філогенетичний аналіз гелікази ДНК *Serratia* phage 4S показав, що вона була дуже гомологічною для фагів *Yersinia* та *Enterobacter* і навпаки віддаленою від гелікази ДНК фагів *Klebsiella* (рис.4.8.):

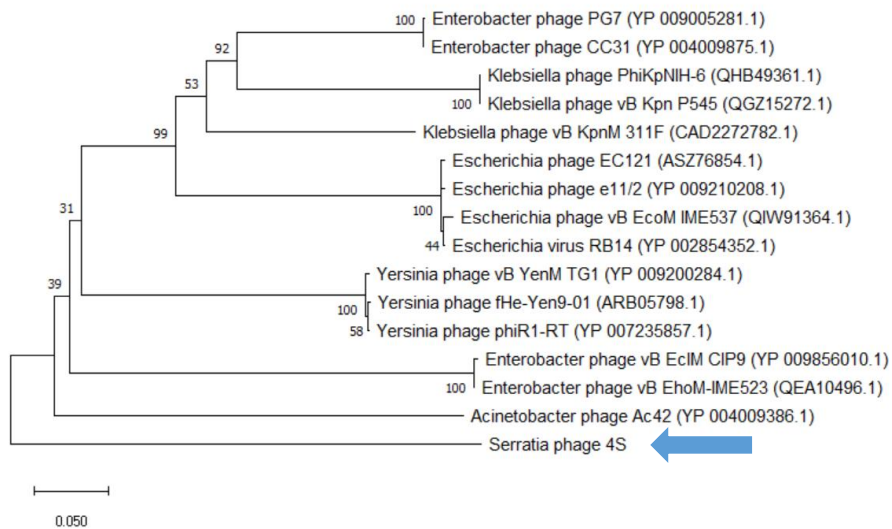


Рис. 4.8. Порівняльний філогенетичний аналіз фаги *Serratia* 4S ДНК з білками виділених фагів в NCBI-BLAST. Філогенетичні дерева були побудовані з використанням вирівнювання ClustalX і методу neighbor-joining в MegaX. Ідентифікатор білка показаний після назви кожного фага в дужках. Суцільна стрілка вказує на розташування *Serratia* phage 4S. Кількість бутстреп-реплікацій вказана на вузлах. Амінокислотні заміни на ділянку вказані у межах шкали.

Отже, філогенетичний аналіз вказує на спорідненість даного фагу з фагами інших штамів *Serratia* та ентеробактерій, які є збудниками як фітобактеріозів, так і опортуністичних інфекцій людини. Наявність проаналізованого геному є важливим фактором для оцінки цього фагу як кандидата у фагові препарати.

Даний бактеріофаг також було перевірено на ефективність пригнічувати розвиток бактеріозу *in planta*. Оскільки *S.marcescens* неодноразово була ізольована саме зі зразків гнилої цибулі, скористались методом інокуляції лусок цибулі. Ізолят бактеріофагів 4S повністю пригнічував розвиток бактерії, мацерація тканин не спостерігалась (рис.4.9.):



А)

Б)

В)

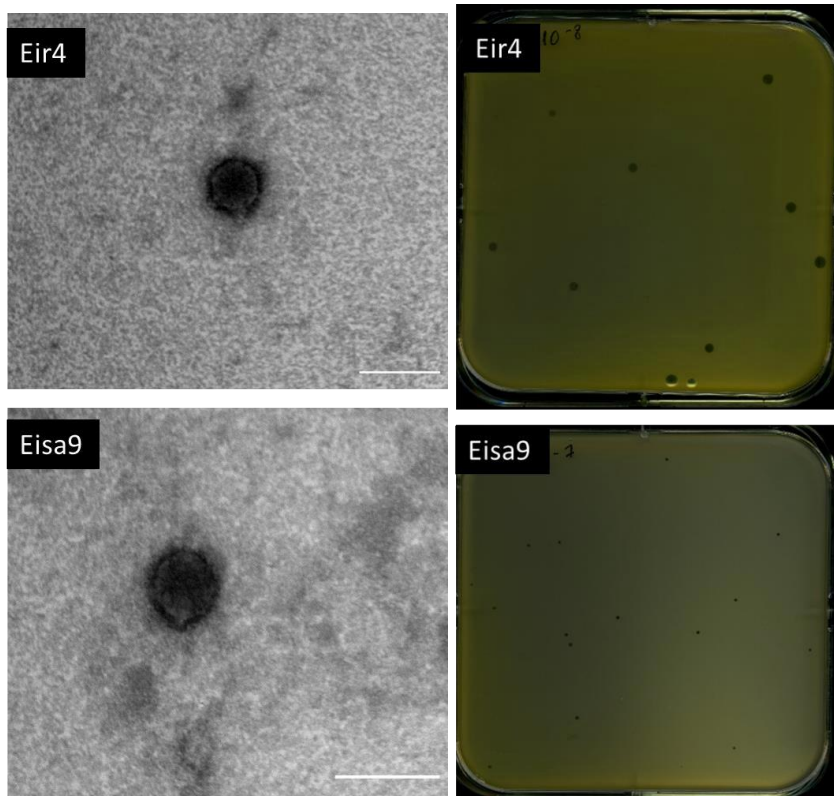
Рис. 4.9. Вплив фага 4S на перебіг інфекції, викликаной *S.marcescens*: А) контроль (0.9% NaCl); Б) обробка культурою *S.marcescens*; В) обробка культурою бактерії та бактеріофагу 4S

На лусках цибулі, оброблених сумішшю фаг+бактерія, не спостерігали утворення гнилі чи типових симптомів для бактеріозу. Як і в попередньому досліді із фагом Eh1, вірус і бактерія були нанесені на зовнішню поверхню рослинної тканини, і бактеріофаг встиг лізувати всі бактеріальні клітини у зразку до того, як бактерія проникла в тканини. Тим не менш, 4S має високі літичні здібності і швидкість його дії є перевагою в контексті фаготерапії.

#### 4.4. Характеристика бактеріофагів *Pst* DC 3000

Два фаги, названі експериментально Eir4 і Eisa9, були виділені з рослин перцю із симптомами бактеріальної плямистості. За допомогою TEM була визначена морфологія: ікосаедричні капсиди 55-60 нм з короткими хвостами, які є типовими морфологічними особливостями подовірусів або їх найближчих родичів. Після ізоляції та очищення була випробувана здатність фага лізувати *Pst* DC3000. Обидва фаги показали літичну активність проти *Pst*

DC3000, що призвело до утворення чистих бляшок на бактеріальному газоні. Фагові Eir4 утворювали більші бляшки ( $d = 4$  мм), ніж Eisa9 ( $d = 0,9-1$  мм) (рис. 4.10.)



А)

Б)

Рис. 4.10. Електронні фотографії та негативні колонії фагів Eir4 та Eisa9: А) Морфологія Eir4 (морфотип С1, капсид 65 нм, хвостовий відросток 9 нм) та Eisa9 (морфотип С1, капсид 60 нм, хвостовий відросток 8 нм). Бар 100 нм; Б) Морфологія негативних колоній

Фаги були пропаговані на культурі *Pst* DC3000. Для оцінки потенціалу ізольованих фагів у фаготерапії ми перевірили специфічність діапазону Eir4 та Eisa9 хазяїна проти ряду рослинних патогенних бактерій з колекції Інституту патофізіології рослин (Чехія) методом спот-тесту. Обидва фаги лізували такі патовари як *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (і його мутанта *hrcC*-), *P. syringae* pv. *syringae* 4073, *P. syringae* pv. *morsprunorum* OPPB, *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394. Eir4 також виявився специфічним до патовару *P. syringae* pv.

*coronafaciens* 9030 та двох штамів виду *P. putida*. Цікавим виявилась чутливість наших фагів до бактерій інших родів, а саме *Xanthomonas vesicatoria* 2101, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* ССМ 1449, а фаг Eir4 також виявив здатність лізувати бактерію *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* IVIA 241/1 (таблиця 4.4.).

Таблиця 4.4. Спектр хазяїв бактеріофагів Eir4 та Eisa9 серед потенційних бактеріальних штамів

<b>Бактеріальний штам</b>	<b>Eir4</b>	<b>Eisa9</b>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	++	++
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> CUCPB5112 <i>hrcC</i> - (мутант <i>Pst</i> DC3000)	++	++
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> 4073	++	++
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> OPPB	++	+
<i>Pseudomonas syringae</i> 8511	+	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> 1022	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 4394	+	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> 9030	+	-
<i>Pseudomonas putida</i> P-14	+	-
<i>Pseudomonas putida</i> B-115T	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> 4326	-	-

<i>Pseudomonas fluorescens</i> DBM3506	-	-
<i>Pseudomonas veronii</i> DBM3208	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> cmm 2115	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i> pv. <i>gypsophilae</i> 2406	-	-
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 4341	-	-
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> 3113	-	-
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	-	-
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 7035	-	-
<i>Erwinia amylovora</i> 8/95	-	-
<i>Erwinia amylovora</i> 5032	-	-
<i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> IVIA 241/1	++	-
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> 1077	-	-
<i>Ralstonia solanacearum</i> 2505	-	-
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> CCM 1449	+	+
<i>Xanthomonas vesicatoria</i> 2101	+	+

Примітка: «++» - чіткий лізис, прозора негативна колонія, «+» - лізис з деякою турбідністю, «-» - відсутність лізису.

Для обох фагів були проведені експерименти з адсорбції і побудовані криві кінетики лізису. Як для Eir4, так і для Eisa9, 98% фагів були незворотно адсорбовані на клітини хазяїна протягом однієї хвилини з швидкістю адсорбції  $k = 5.8 \times 10^{-10}$  для Eir4 і  $6.34 \times 10^{-10}$  для Eisa9, що досить схоже на деякі інші фаги *Pseudomonas* (189), але повільніше, ніж фаг φ6 (190). Криві кінетики

лізису були створені шляхом інокуляції *Pst* DC3000 за MOI 1 і 0.1 у рідкому LB середовищі. Оптична щільність рідкої культури *Pst* при 600 нм зменшилася після 80 хвилин для Eir4, а для Eir9 лише після 125 хвилин (рис. 4.11.).

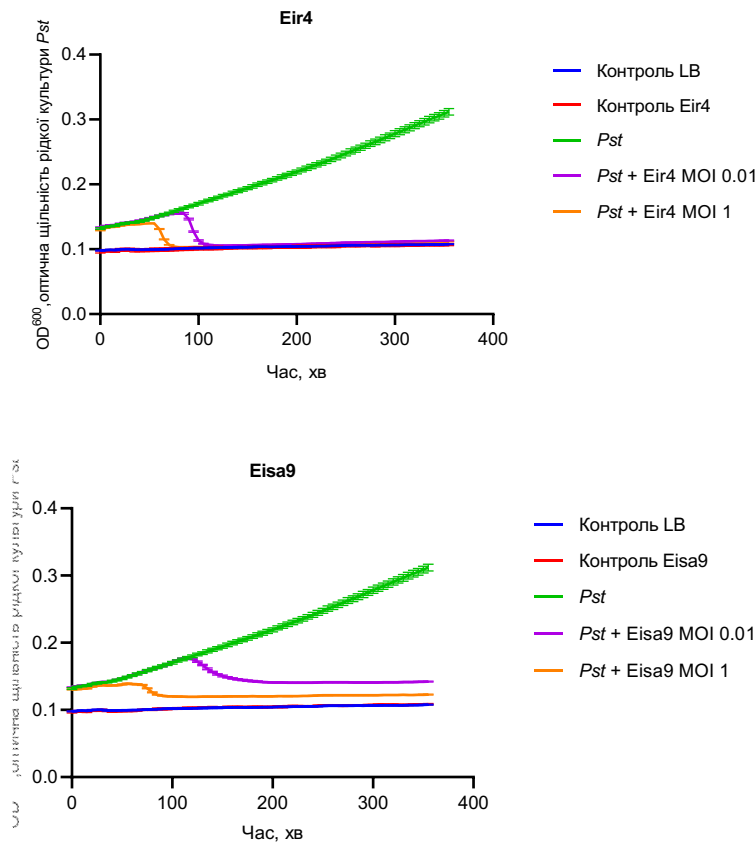


Рис. 4.11. Динаміка росту бактерії *Pst* за відсутності та присутності фагів.  $OD^{600}$  – оптична щільність за довжини хвилі 600 нм ( $OD^{600} = 0.1$  відповідає концентрації бактерії  $5 \times 10^7$ ); MOI – множинність інфекції, співвідношення концентрації фага до бактерії в залежності від об’єму (мл).

Оцінка стабільності за різних температур показала, що як Eir4, так і Eisa9 були стабільними в діапазоні помірних температур від 4 °C (температура інкубації) до 26 °C (температура для росту *Pst*) (рис. 4.12.). Помітне зниження життєздатності фага спостерігалось вже після 6 годин попереднього нагрівання при 37 °C або замерзання при -20 °C Це відповідає оптимальним температурам для вірулентності *Pst* в тепличних умовах на рослинах томатів (191).

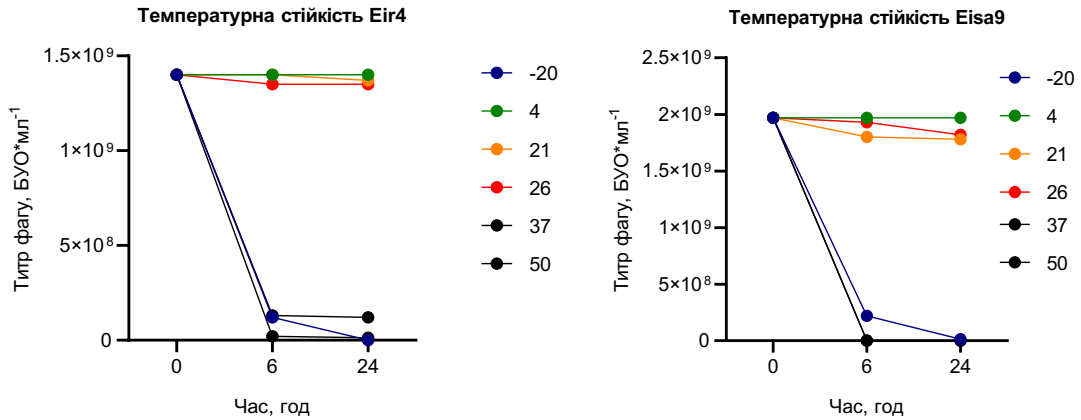


Рис. 4.12. Інфекційність фагів Eir4 та Eisa9 за різних температур у стандартному буфері SM. Результати оцінювались через 6 та 24 год інкубації. Концентрацію визначали методом спот-тесту.

Що стосується стабільності рН, обидва фаги підтримували інфекційність в нейтральних або злегка лужних умовах (рН = 7-9), тоді як нижчий або вищий рН значно знижував титри через 6 годин (рис. 4.13.). Це є нормою для більшості бактеріофагів згідно літературних даних.

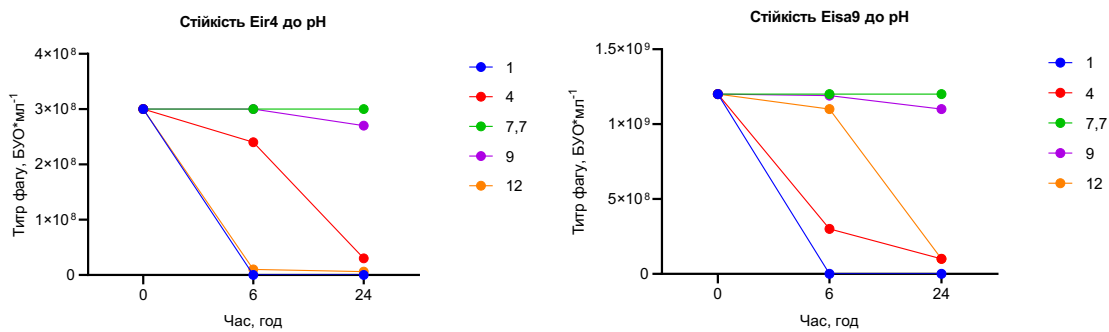


Рис. 4.13. Інфекційність фагів Eir4 та Eisa9 за різних значень рН. Результати оцінювались через 6 та 24 год інкубації. Концентрацію визначали методом спот-тесту.

Спот-тести з супернатантами з нічних культур стійких штамів не передбачали індукції лізогенізації. Крім того, всі фаги регулярно утворювали чіткі бляшки, що є однією з ознак нелізогенного циклу. Також 5 одиночних колоній *Pst*, вирощених на чашці (на місці, де спостерігали повний лізис), були

підібрані і перевірені на стійкість до фагів. З них 2 ізоляти росли повільніше за контрольну культуру, 2 росли нормально і були чутливими до бактеріофагів, а 1 – стійким.

Отже, дослідивши фаги *Pst* DC3000 Eir4 та Eisa9 отримали їх морфологічну та фізичну характеристики. Фаги є стійкими за значень рН у діапазоні 7-9 та температурах від 4 °С (температура зберігання) до 26 °С (температура росту *Pst*), що є нормальним для фагів цього бактеріального роду згідно літературних даних. Фаги мають морфологію, типову для подофагів (представників родини *Podoviridae* за старою класифікацією), що також розповсюджено серед фагів цього типу, проте необхідний детальний геномний аналіз, який дозволить говорити про більш точне таксономічне положення цих вірусів, оскільки типову для подовірусів морфологію можуть мати зокрема представники родини *Autographiviridae*, яка була відокремлена в окрему родину у 90-х роках минулого століття.

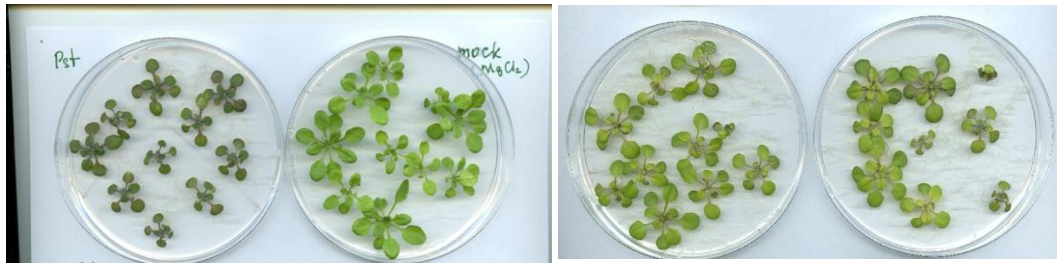
## РОЗДІЛ 5

### ВПЛИВ СУМІСНОЇ ІНОКУЛЯЦІЇ БАКТЕРІЄЮ ТА БАКТЕРІОФАГАМИ НА РОСЛИННИЙ ОРГАНІЗМ

Для дослідження механізмів взаємодії між рослинами, патогенними бактеріями і фагами ми використовували модельну систему, що складається з *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (далі - *Pst*), двох специфічних бактеріофагів Eir4 та Eisa9 і рослини *Arabidopsis thaliana*. Бактерія і рослина в цій системі є однаково досконало вивченими організмами, тому ми скористалися цією можливістю і відтворили всі стандартні методи інокуляції *A.thaliana* щоб перевірити вплив одночасного навантаження бактеріофага та бактерії на рослинний організм.

#### 5.1. Оцінка антибактеріальної активності фагів Eir4 та Eisa9 в умовах флад-інокуляції

Методом флад-інокуляції було оброблено три групи двотижневих рослин *A.thaliana* на чашках з напівщільним середовищем MS. Перша група була контрольною, яку інокулювали лише розчином 10 mM MgCl<sub>2</sub>; другу інокулювали бактерією, а третю – сумішшю бактерії та фагів. Рослини з чашок збирали через два дні після інокуляції. Цей метод продемонстрував, що концентрація *Pst* зменшується в зразках, щеплених сумішшю бактерій і фагів, також не демонструючи видимих симптомів на листках *A.thaliana* (рис. 5.1).



А) Б) В) Г)

Рис. 5.1. Вплив бактеріофагів Eir4 та Eisa9 на перебіг інфекції у 2-тижневих рослинах *A.thaliana*, оброблених за методом флад-інокуляції: А) *Pst*; Б) контроль (буфер 10 mM MgCl<sub>2</sub>); В) *Pst* та Eir4; Г) *Pst* та Eisa9

Фаги не лізували бактерію у зразках повністю, але значно обмежили їх ріст, оскільки концентрація в зразках з Eir4, наприклад, статистично відрізнялась від бактеріального контролю (рис.5.2.):

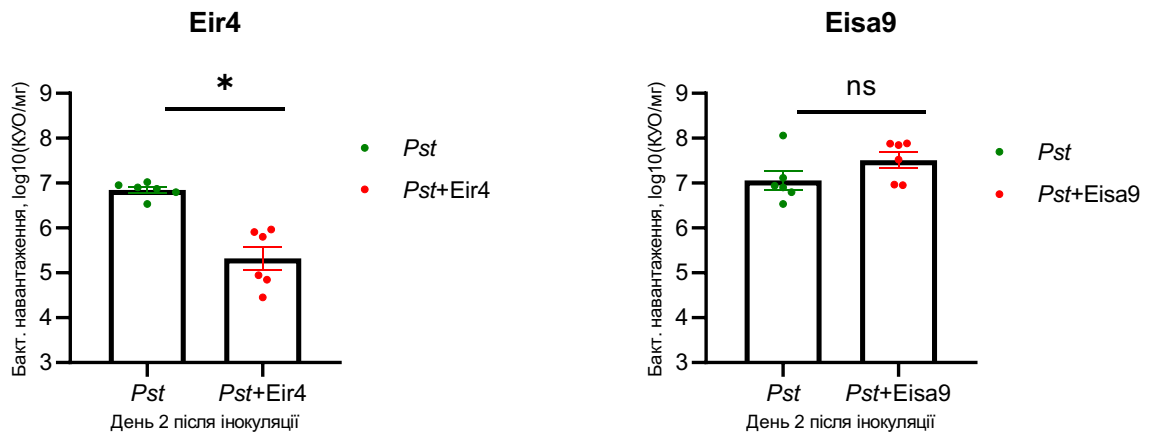


Рис. 5.2. Бактеріальне навантаження *Pst* в рослинах, оброблених за методом флад-інокуляції (ns –  $p > 0.1$  у порівнянні з *Pst*, \*-  $p < 0.05$ )

Проте фаг Eisa9 поведив себе трохи інакше за Eir4: бактеріальне навантаження в рослинах, інфікованих сумішшю з ним, не відрізнялось від такого у рослинах, інфікованих лише бактерією. Більше того, в повторах експерименту ця концентрація навіть могла перевищувати контрольну. Ми припустили, що це може бути пов'язаним зі специфічними взаємовідносинами

цього фага з *Pst*, які ми бачили на кривих кінетики лізису фагами у Розділі 4, або нестабільність фага внаслідок дії рослинних протеаз та відносно несприятливого середовища в апопласті. Враховуючи низьку ефективність лізису цим фагом, в подальших експериментах ми використовували лише Eir4.

У триденному експерименті із цим типом інокуляції, коли зразки відбирались на день 1, день 2 та день 3, спостерігалось поступове зменшення кількості бактеріофагів в рослинних зразках (рис. 5.4.), в той час, як концентрація бактерій зростала (рис. 5.3.)

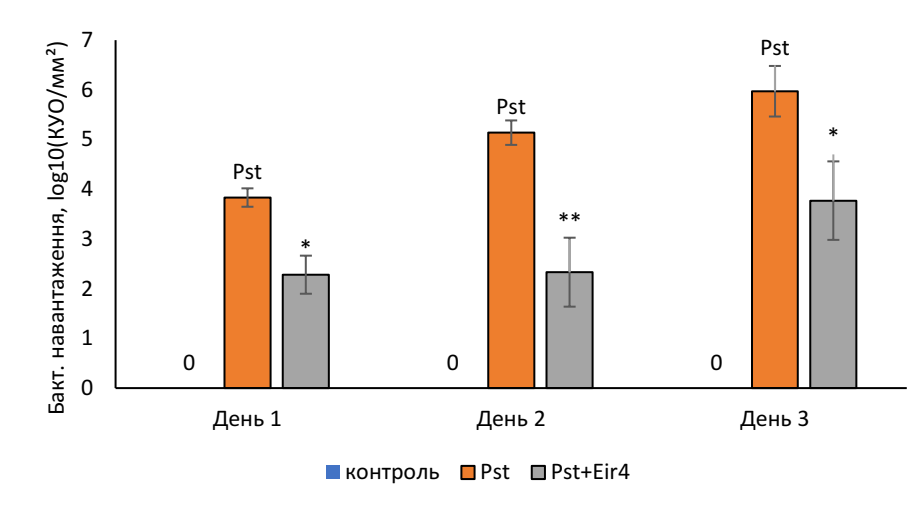


Рис. 5.3. Бактеріальне навантаження *Pst* у рослинах після обробки з фагами в умовах флад-інокуляції. Контроль - стерильний буфер 10 mM MgCl<sub>2</sub>, на основі якого приготовані інші суспензії для інокуляції: бактеріальний контроль *Pst* та суміші *Pst* з фагами. Бактеріальне навантаження  $\log_{10}(\text{КУО}/\text{мм}^2) = \text{кількість колоній} \times \text{ступінь розведення} \times 200 / \text{вага зразка, мг}$ . Результати трьох біологічних повторів, середнє значення бактеріального навантаження  $\pm$  стандартне відхилення. \* -  $p < 0.05$ , ns – різниця статистично недостовірна.

Для розуміння, як змінилась концентрація вірусу в рослині за два дні, весь рослинний матеріал, який розтитровували для визначення концентрації бактерії, використали і для визначення титру бактеріофага.

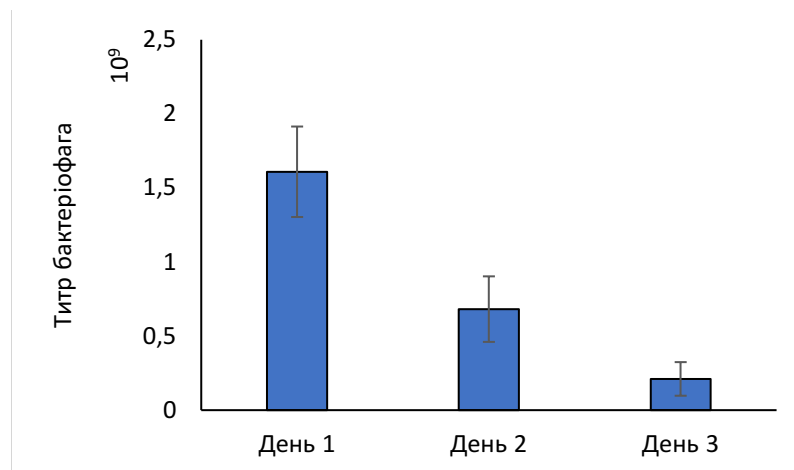


Рис. 5.4. Концентрація бактеріофага в рослинному матеріалі після флад-інокуляції. Середнє значення титрів  $\pm$ стандартне відхилення, титр визначався методом спот-тесту.

На третій день з рослинного матеріалу ще можна було ізолювати бактеріофаги, але в значно меншій кількості в порівнянні з першим днем. Це може бути пов'язано як з появою резистентних до цих фагів бактеріальних клітин, що, як потім буде досліджено нами, є досить частим явищем в цій системі фаг-бактерія, так і з впливом рослин на віруси, наприклад, дії рослинних ферментів, рН, тощо. Тим не менш, різниця в концентрації бактерії у рослин, які були оброблені сумішшю фага і бактерії, і тих, які були інокульовані лише бактерії, була суттєвою навіть на третій день. Це говорить про:

- ефективність даного методу в демонстрації дії фаг-бактерія: кількаразова поступова обробка фагами може повністю знищити сприятливі бактерії;

- те, що в даному методі (особливо в перший день) бактерія та фаги взаємодіють на поверхні рослини і, ймовірно, фаги встигають лізувати більшість бактеріальних клітин перш ніж ті потраплять всередину рослин.

Отже, ми зробили попередній висновок про те, що обробка фагами рослин ззовні може бути ефективною у конкретному випадку з *Pst* і що ці фаги

теоретично могли би бути використані у фаготерапії фітобактеріозів, викликаних *Pst* за умови зовнішньої та кількарязової обробки. Проте досі незрозумілим лишається питання щодо зменшення кількості фагів у зразках з часом, оскільки теоретично вірус має знаходитись в зразку до тих пір, доки там є чутлива бактерія, концентрація якої має або падати з часом, або лишатися стабільною.

## 5.2. Оцінка антибактеріальної активності фага Eir4 за умови інфільтрації в листок

Наступним кроком була перевірка нашої тристоронньої системи методом інфільтрації. Під час інфільтрації бактерія і фаг вводяться всередину листка 4-тижневих рослин *A.thaliana*, але не пошкоджуючи тканини (за допомогою шприця без голки). Цей метод дозволяє нам побачити як бактерія та фаг поведуть себе всередині рослини і як це впливає на її життєдіяльність (рис.5.5.).

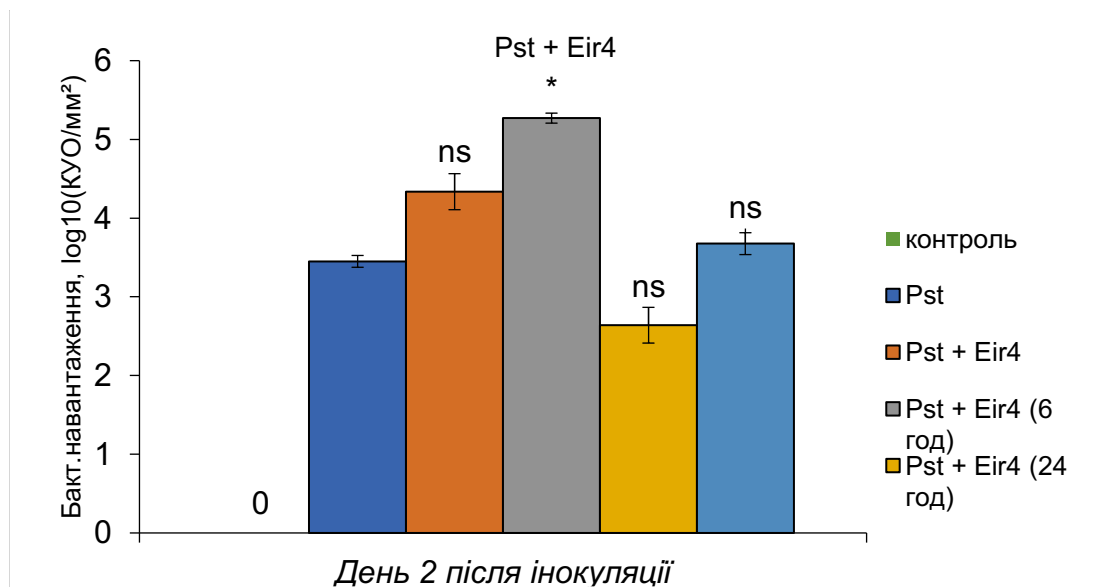


Рис. 5.5. Бактеріальне навантаження у 4х-тижневих рослинах після обробки з фагами методом інфільтрації. Контроль - стерильний буфер 10 mM MgCl<sub>2</sub>, на основі якого приготовані інші суспензії для інокуляції:

бактеріальний контроль *Pst*, суміші *Pst* з фагами, пре-інкубовані за 24 і 6 годин до інфільтрації. Бактеріальне навантаження ( $\log_{10}$  КУО/мм<sup>2</sup>) = кількість колоній×ступінь розведення×200/(3×(3.1415×36/4)), ns –  $p>0.1$  у порівнянні з бактеріальним контролем *Pst*, \* -  $p<0.1$ , \*\* -  $p<0.05$

За результатами цього експерименту, інокульовані за методом інфільтрації бактеріофаги не показали значного ефекту в листках, в які вони були інфільтровані разом з бактеріями; також не було видимої різниці в симптомах у порівнянні з контролем *Pst*. Пре-інокуляція рослин фагами не попереджувала наступну бактеріальну інфекцію, але фагові бляшки спостерігалися на чашках, демонструючи стабільність фагів всередині рослин протягом 72 годин, а також інфекційність після виділення їх з рослинних тканин. Хоча пре-інокуляція фагами і змішування їх з бактеріями безпосередньо перед обробкою не допомогла, попередня інкубація протягом певного часу до інокуляції (24 год) показала деяку ефективність. Експеримент було відтворено знову, проте замість преінокуляції четверта група рослин була інокульована суспензією фага і бактерії, що була попередньо інкубована за 24 години. Кількість КУО розраховувалась на день 1, день 2 та день 3 (рис. 5.6.).

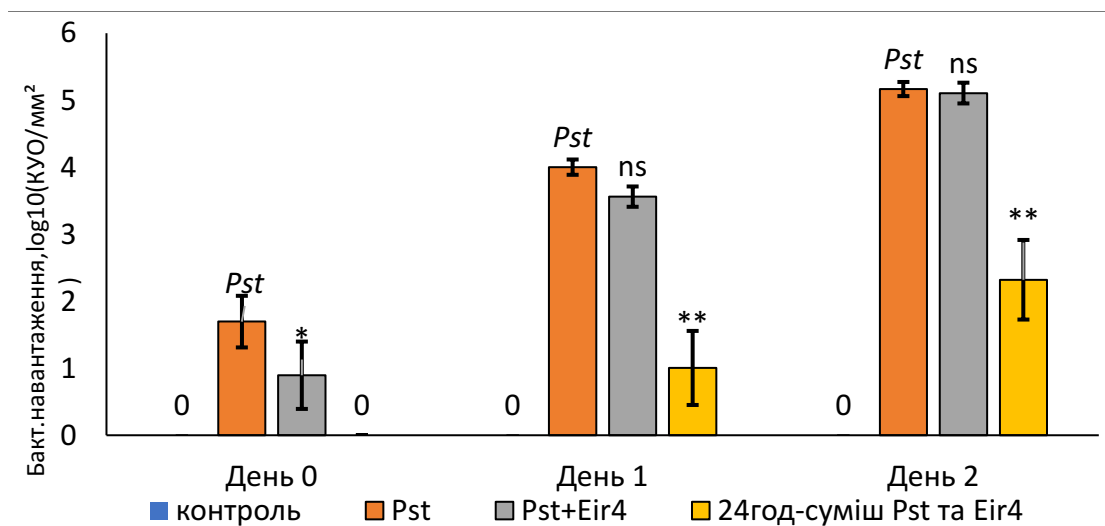


Рис. 5.6. Бактеріальне навантаження у 4х-тижневих рослинах після обробки з фагами методом інфільтрації. Контроль - стерильний буфер 10 mM

MgCl<sub>2</sub>, на основі якого приготовані інші суспензії для інокуляції: бактеріальний контроль *Pst*, суміші *Pst* з фагами (сірий колір – суміш приготована перед інокуляцією, жовтий – суміш інкубувалась 24 години перед інокуляцією). Бактеріальне навантаження ( $\log_{10}$  КУО/мм<sup>2</sup>) = кількість колоній×ступінь розведення×200/(3× (3.1415×36/4)), ns – p>0.1 у порівнянні з бактеріальним контролем *Pst*, \* - p<0.1, \*\* - p<0.05.

На день 1 та день 2 в рослинах, інокульованих сумішшю фага і бактерії, та тих, де фаги перед інокуляцією інкубували разом з бактерією протягом 24 годин, концентрація *Pst* була суттєво нижча за контроль. Проте, поступове зростання концентрації бактерії в зразках може свідчити як про накопичення фагорезистентних штамів, так і про нестабільність фагів в рослинному внутрішньому середовищі або те, що фаги «застряють» у тканинах інфільтрованого ними листка і не можуть впливати на подальший ріст бактерій. Наші наступні експерименти із GUS-гістохімічним аналізом підтвердили ці результати.

Отже, на даному етапі нами було проаналізовано можливості інфільтрації дорослих рослин з фагом та бактерією, проте віруси не показали літичної активності за даного методу інокуляції, що ми пов'язуємо з впливом внутрішніх чинників рослини. Даний метод не рекомендується використовувати для оцінки ефективності фагів.

### **5.3. Оцінка антибактеріальної активності фага Eir4 за умови інокуляції проростків у рідкому середовищі**

Наступним методом інокуляції було обрано метод інкубації рослин у рідкому MS середовищі з вітамінами. Даний метод цікавий тим, що паростки *A.thaliana* протягом 10 днів зростають в рідкому середовищі і буквально плавають в ньому. Нами було висунуто гіпотезу про те, що, можливо, фагам

буде легше взаємодіяти із рослиною і проникати всередину неї в такому середовищі. Ймовірність адсорбції на бактеріальних клітинах також підвищується за таких умов.

За схемою основного експерименту по цьому методу, ми виокремили такі групи рослин: контрольна група, інокульована як і в попередніх методах 10 мМ буфером  $MgCl_2$ ; група, інокульована *Pst*; групи, інокульовані сумішами *Pst* та EIR4 за різних MOI; та групи, які були інокульовані фагом за певний проміжок часу до інокуляції бактерією (рис. 5.7.).

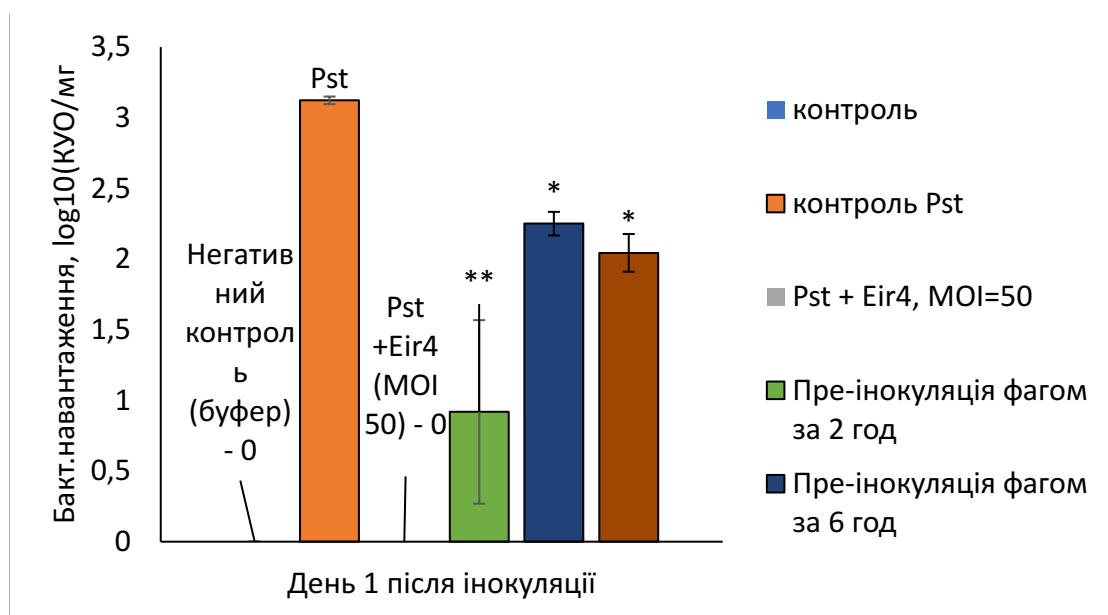


Рис. 5.7. Бактеріальне навантаження у проростках *Ath in vitro* після обробки разом з фагами та після превентивної обробки фагом. Контроль - стерильний буфер 10 мМ  $MgCl_2$ , на основі якого приготовані інші суспензії для інокуляції: бактеріальний контроль *Pst*, суміш *Pst* з Eir4, суспензія фага. Бактеріальне навантаження  $\log_{10}$  (КУО/мг) = кількість колоній  $\times$  ступінь розведення  $\times$  200/вага зразка, мг, \* -  $p < 0.1$ , \*\* -  $p < 0.05$

Результати виявилися вражаючими, оскільки у всіх групах рослин, інокульованих сумішами бактерії та фага, ріст бактерії був відсутній зовсім. В той же час, преінокуляція фагом була ефективною лише за 2 години до інокуляції бактерією. Такі результати доповнюють наші результати по флад-

інокуляції, оскільки тут бактеріофаг також взаємодіяв ззовні рослини. Це може пояснити і те, чому преінокуляція за 2 години до обробки бактерією знизилася концентрація бактерії в порівнянні з преінокуляцією за 6 та 24 години. Ми висунули припущення, що на фаги могли вплинути як зовнішні фактори (освітлення та вологість в інкубаторі), так і рослинні ферменти. При повторенні цього експерименту, ми виділили бактеріофаги з рослин тих груп, де вони були інокульовані (рис.5.8.)

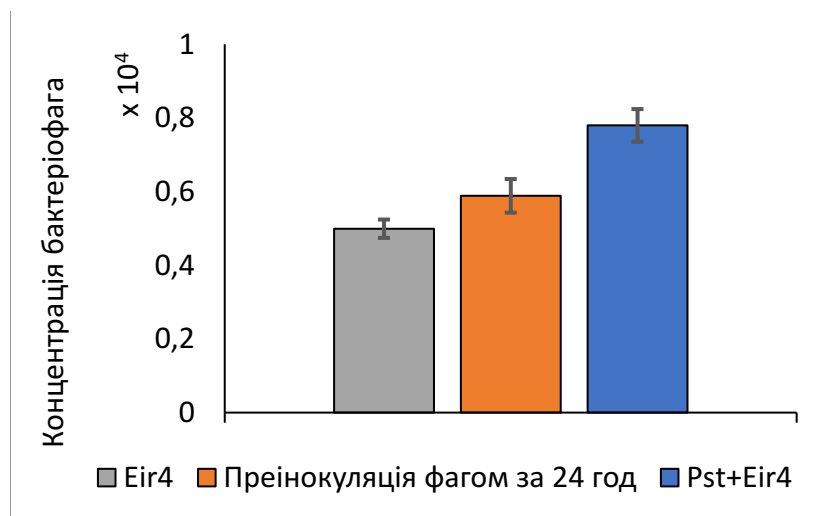


Рис. 5.8. Концентрація бактеріофагів у проростках *Ath in vitro* після інокуляції у рідкому середовищі. Середнє значення титрів  $\pm$ стандартне відхилення, титр визначався методом спот-тесту.

Фаги все ще можна було виділити як з рослинного матеріалу, так і з лунок, в яких був лише фаг (без рослин і бактерії, лише MS середовище). Отже, наше попереднє припущення про те, що на стабільність фагу могли вплинути фактори середовища інкубатора, не підтвердилось, оскільки фаг зберігав стійкість та інфекційність навіть після двох діб в таких умовах.

Спостерігаючи за результатами експериментів із застосуванням трьох описаних методів інокуляції, ми дійшли наступних висновків:

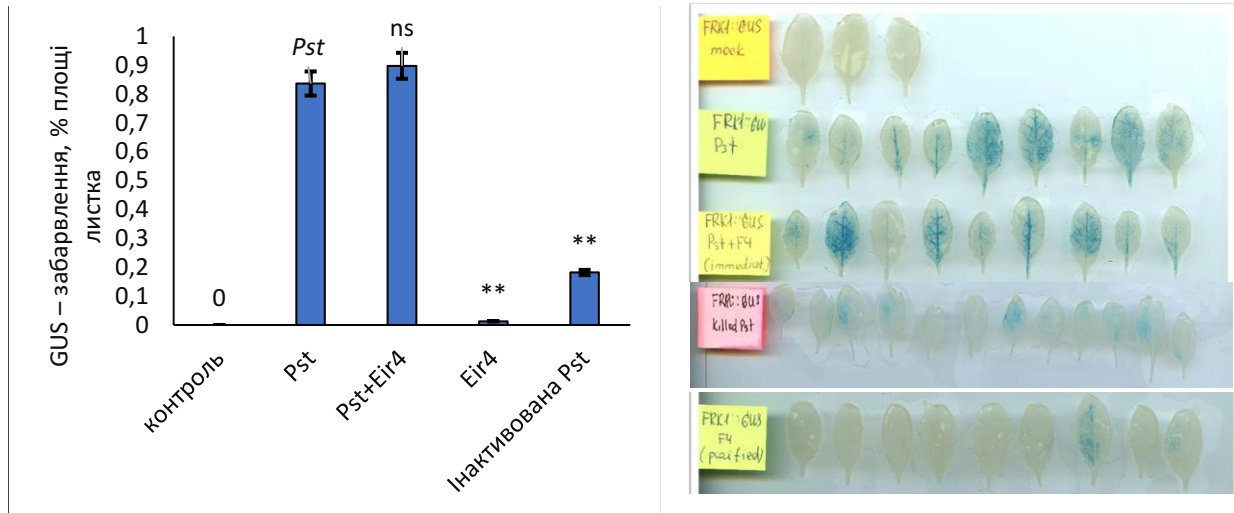
- для фаготерапії та для дослідження літичної дії бактеріофагів *in vitro* найбільше підходять методи інокуляції, за яких рослини обробляються фагами зовнішньо: спреєм, поливом, тощо;
- Метод інокуляції у рідкому середовищі є найбільш ефективним для дослідження ефективності фагів у пригніченні росту бактерій, є швидким у порівнянні з іншими опрацьованими нами методами і може бути рекомендований, як універсальна методика.

#### 5.4. GUS-гістохімічний аналіз та дослідження імунної відповіді рослин

Паралельно з дослідженням впливу бактеріофагу на перебіг інфекції, викликаной *Pst* у *A.thaliana*, ми також використали методику, яка дозволяє дослідити імунну відповідь на рослинах-мутантах, які містять конструкти, що дозволяють візуально побачити реакцію рослини на ураження - *PR1::GUS* та *FRK1::GUS*. *PR1* – білок ранньої імунної відповіді, а *FRK1* відповідає за ранній захисний сигналінг. Обидва ці білки синтезуються в першу чергу під час інфікування арабідопсиса бактерією. *GUS* – репортерний ген бета-глюкоронідази, мітка, яка дозволяє візуалізувати місце в рослинних тканинах, где *FRK1* та *PR1* продукуються найбільше у відповідь на інфекцію. Для того, щоб це зробити, використовують X-GLUC - речовину, яка є субстратом для *GUS*. Продукт реакції розщеплення цього субстрату дає синій колір, який можна чітко побачити після знебарвлення інфільтрованих патогенами листків. Нашою метою було дослідити, як фаг і бактерія, окремо і разом, впливають на синтез цих білків і чи запускає сам фаг імунну реакцію у рослини.

Для цього ми інфільтрували рослини за методикою, описаною в попередніх розділах, розділивши дорослі рослини арабідопсиса на наступні групи: контроль з 10мМ розчином  $MgCl_2$ , рослини, інокульовані живою або вбитою бактерією; рослини, інокульовані сумішшю фага і бактерії та виключно фагом. Рослини фарбували в розчині X-GLUC, знебарвлювали,

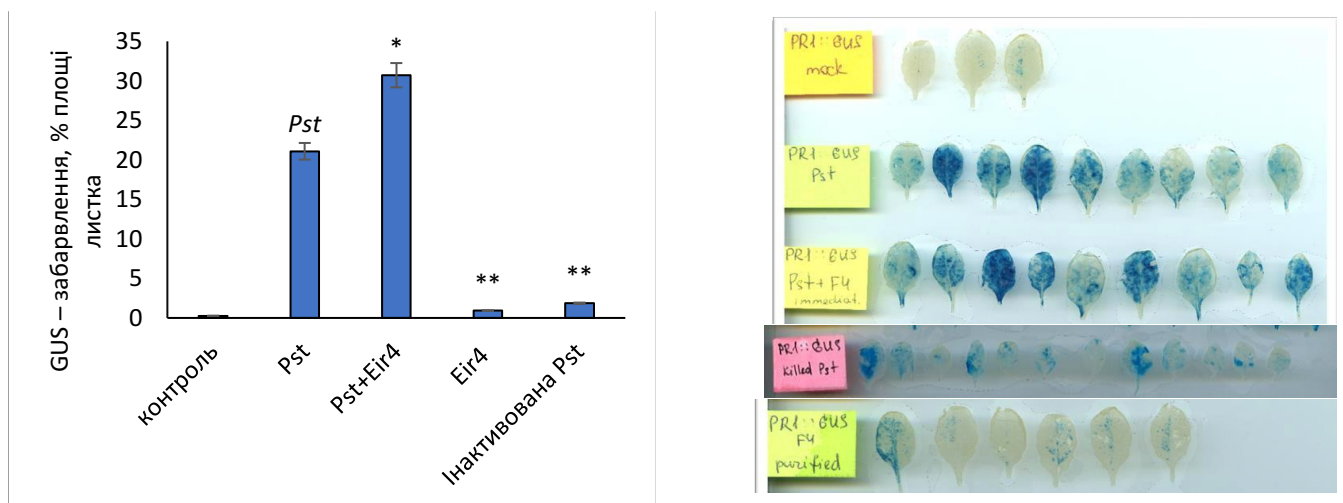
сканували на офісному сканері у високій якості зображення, і отримані зображення обробляли у програмі FiJi, підраховуючи відсоток забарвленої площі листка (рис.5.9. - 5.10.):



A)

Б)

Рис. 5.9. Інтенсивність продукції GUS в FRK1::GUS-рослинах, інфільтрованих *Pst*, сумішшю *Pst* + фаг, очищеним фагом та інактивованою *Pst*: А) відсоток забарвлення за GUS; Б) скан листків, по якому проводилось обчислення результатів (ns –  $p > 0.1$  у порівнянні з бактеріальним контролем *Pst*, \*\* -  $p < 0.05$ ). Активація промотору *FRK1* визначалась шляхом вимірювання інтенсивності забарвлення листків для кожної групи.



A)

Б)

Рис. 5.10. Інтенсивність продукції GUS в PR1::GUS-рослинах, інфільтрованих *Pst*, сумішшю *Pst* + фаг, очищеним фагом та інактивованою *Pst*: А) відсоток забарвлення за GUS; В) скан листків, по якому проводилось обчислення результатів (ns –  $p > 0.1$  у порівнянні з бактеріальним контролем *Pst*, \* -  $p < 0.05$ ). Активація промотору *PR1* визначалась шляхом вимірювання інтенсивності забарвлення листків для кожної групи.

За результатами, отриманими після обробки сканів листків, ми побачили, що сам фаг і інактивована (шляхом кип'ятіння) бактерія майже не індукували синтез GUS в той час, як суміш бактерії з фагом викликав реакцію сильнішу, ніж бактеріальний контроль. Оскільки листки, інокульовані лише фагом, були забарвлені мінімально, мова про індукцію або запуск імунітету рослини вірусом не йде. В цьому випадку забарвлення могло бути ініційовано рештками бактерій та продуктами лізису, що лишились у лізаті. Таке саме пояснення можливе у випадку суміші бактерія+фаг: посилений синтез білків захисту може бути відповіддю на лізис бактерій вірусами, не дивлячись на те, що під час інфільтрації фаг не проявляє суттєвої активності.

Беручи до уваги, що найефективнішим методом інокуляції виявився метод із рідким середовищем, ми вирішили провести окремі експерименти з цим методом, але вже із подальшим фарбування по GUS. На цей раз, окрім контролю, бактерії і суміші з фагом, окрема група лунок с проростками була преінокульована фагом Eir4 за 24 години до інокуляції бактерією (рис.5.11.):

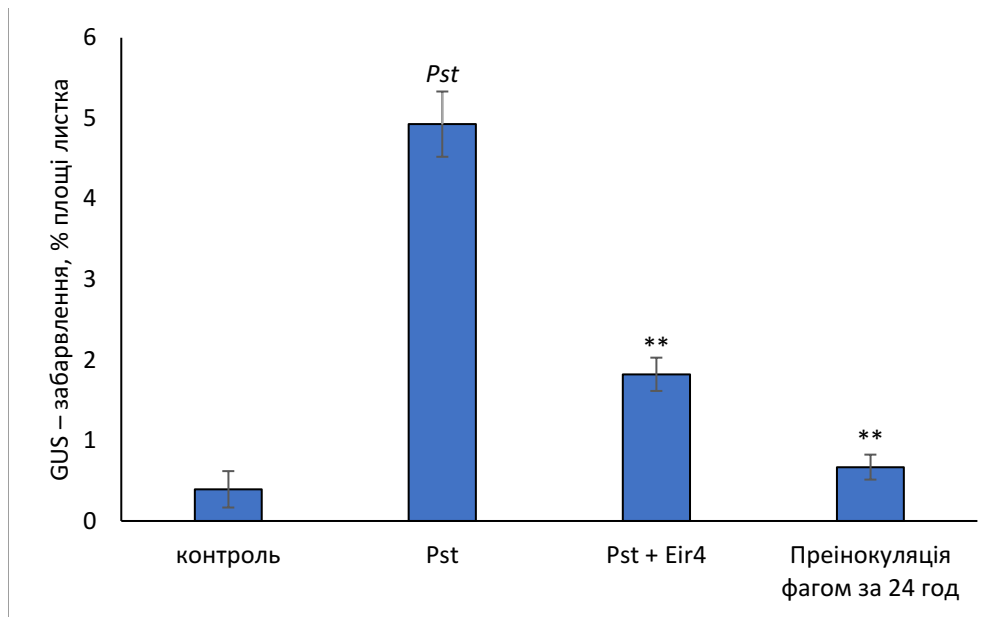


Рис. 5.11. Інтенсивність синтезу GUS у PR1::GUS-рослинах, інфільтрованих *Pst*, сумішшю *Pst* + фаг, та превентивно інокульовані Eir4 перед обробкою *Pst* (ns –  $p > 0.1$  у порівнянні з бактеріальним контролем *Pst*, \*\* -  $p < 0.05$ ). Активація промотору *PR1* визначалась шляхом вимірювання інтенсивності забарвлення листків для кожної групи.

Отримані результати відповідають тим, що ми бачили під час роботи з даною методикою: концентрація бактерій суттєво зменшувалась при обробці суспензією з фагом, особливо за преінокуляції фагом за добу до обробки. Статистично суттєва різниця між бактеріальним контролем та обробленими фагом рослинами підтверджує пригнічення росту бактерій в середовищі і на рослинах – бактерія не встигла як слід інфікувати рослини у зразках, оскільки була швидко лізована фагом в сприятливих для нього умовах. В той же час преінокуляція фагом (рослини перебували із ним в одній лунці понад дві доби) не індукувала значної відповіді – вона майже не відрізнялась від контролю, який у випадку PR1::GUS рослин завжди має невелике забарвлення.

Отже, гіпотеза про те, що фаги самостійно можуть стимулювати імунну відповідь у рослин, у наших експериментах не підтвердилась. Звісно, ці дані потребують подальшого поглибленого генетичного аналізу, проте перші

висновки вже можна зробити: вивільнені під час лізису клітинні рештки і бактеріальні речовини можуть сприйматися клітинами рослин і призводити до активації синтезу *PR1*. В той же час, активація *FRK1* є флагелін-специфічною, і кількість вільного флагеліна не змінюється, незалежно від того, чи бактерії нешкоджені або ж лізовані фагом, тому більш доречніше при повторенні даних експериментів буде використання саме *PR1::GUS* рослин.

## РОЗДІЛ 6

### ФАГОРЕЗИСТЕНТНІ ШТАМИ *PST DC 3000*

В процесі культивування бактеріофагів Eir4 та Eisa9 разом з *Pst DC3000* фагостійкі штами доволі часто можна було спостерігати на чашках з повним лізисом. Фагорезистентність – одна з проблем фаготерапії, і в той же час невід’ємний етап ко-еволюції фагів та бактерій і їх постійної взаємодії. Останні роки дослідники почали досліджувати вплив фагорезистентності бактерій на їх життєдіяльність, а саме здатність до росту, інфекційність, метаболічні зміни, тощо. Такі зміни патогена можуть суттєво позначитись і на його рослинному хазяї, і мікробіомі рослини в цілому. Беручи це до уваги, ми ізолювали 4 різних фагорезистентних колонії, які виникли на чашках Петрі з повним лізисом. Ці колонії було протестовано на стійкість до наших бактеріофагів Eir4 та Eisa9 – всі 4 ізоляти виявилися стійкими до обох вірусів. Ізолятам були дані відповідні експериментальні назви: Res1, Res2, Res3 та Res4. Маючи такі стійкі ізоляти, ми вирішили перевірити, чи відбулись якісь зміни в їх здатності до росту *in vitro* та *in planta* внаслідок набуття резистентності до вірусів.

#### 6.1. Ріст резистентних ізолятів *in vitro*

Здатність до росту у періодичній системі всіх чотирьох ізолятів досліджували спектрометрично протягом 72 год на спектрофотометрі TECANInfinite ® 200 PRO. В лунки вносились наступні зразки: контроль середовища LB з рифампіцином; контроль нормальної не стійкої нічної культури *Pst*; чотири нічні культури стійких ізолятів (рис. 6.1.):

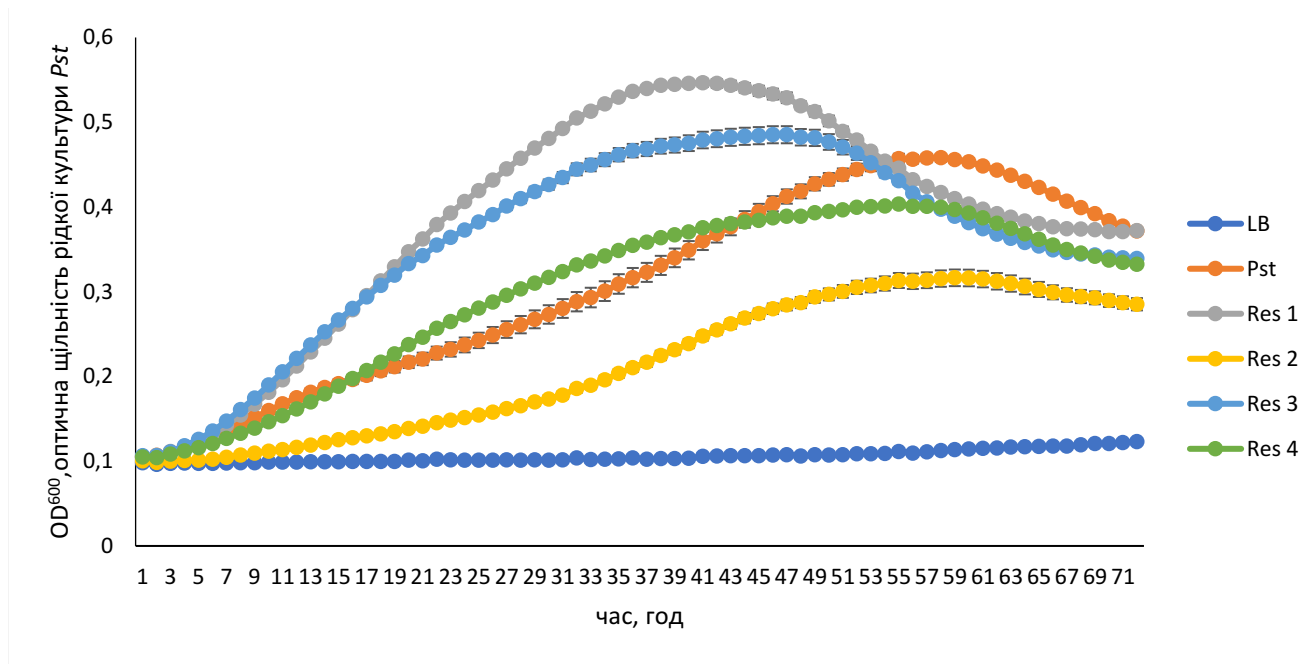


Рис. 6.1. Динаміка росту чутливої *Pst* та резистентних штамів. Культури росли в рідкому LB середовищі з рифампіцином, початкова  $OD^{600} = 0.1$ ,  $t=72$  год.

Ріст ізоляту Res2 був суттєво сповільнений в порівнянні з нормальною бактерією. І навпаки, ізоляти Res1 та Res3 росли в рази активніше ніж контрольний штам. Експеримент було проведено ще в трьох повторностях, але кожен раз ізолят Res2 ріс повільніше за інші і не досягав подібної кінцевої оптичної густини. Отже, набуття стійкості до фагів спровокувало зміни в даному ізоляті в бік пригнічення росту. Наступним етапом було дослідити, чи вплинуло це і на патогенність даних штамів.

## 6.2. Ріст резистентних ізолятів *in planta*

Для перевірки здатності стійких бактерій викликати інфекцію в арабідопсиса та рости всередині рослинного організму ми інфільтрували резистентні ізоляти в листки 4-тижневих рослин (рис.6.2.)

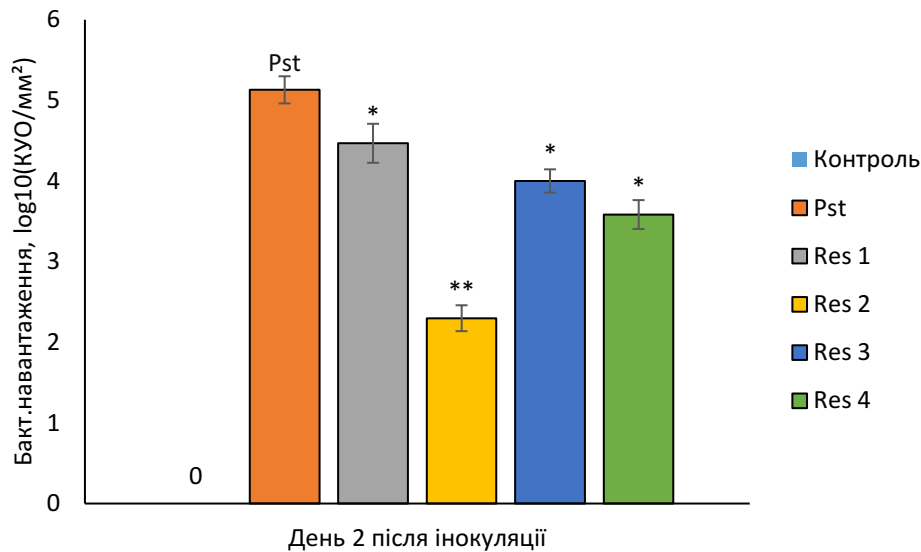


Рис. 6.2. Концентрація фагорезистентних ізолятів *Pst* в інфільтрованих 4-тижневих рослинах арабідопсиса (ns –  $p > 0.1$  у порівнянні з бактеріальним контролем *Pst*, \* -  $p < 0.1$ , \*\* -  $p < 0.05$ )

Ізолят Res2 втратив здатність до нормального росту *in planta* – його концентрація в листках арабідопсиса була у два рази нижча за контрольний та інші стійкі ізоляти. Інокульовані ним листки були майже повністю здорові, без видимих симптомів у вигляді пожовтіння, хлорозів, синдрому «мокрого листка». Ізоляти Res1 та Res3 не втратили здатності до накопичення в рослині, як і до росту *in vitro*. Однак, ізолят Res4 відрізнявся від інших ізолятів тим, що не дивлячись на нормальні показники росту *in vitro*, його здатність до росту всередині рослини суттєво зменшилась. Цей ізолят також провокував не такі сильні симптоми, як ізоляти 1 чи 3. Отже, окрім Res2 суттєві зміни в життєдіяльності та здатності інфікувати рослину відбулися і в ізоляті Res4. Такі спостереження дають підстави говорити про контекстну залежність набутої фагорезистентності у фітопатогенів.

### 6.3. Інфільтрація стійкими ізолятами мутантів *nahG*

Попередні результати надихнули нас на проведення експериментів із мутантами арабідопсису *nahG*. В рослинах, які містять трансген *nahG*,

саліцилова кислота перетворюється на катехол, внаслідок чого її метаболізм пригнічується і рослина втрачає резистентність до патогенів, до яких вона навіть не чутлива. Внаслідок цього, рослини хворіють більш виражено. Отже, ми інфільтрували Res 2 та Res 4 у 4-тижневі рослини і підраховали концентрацію бактерій на другий день після інокуляції (рис.6.3.):

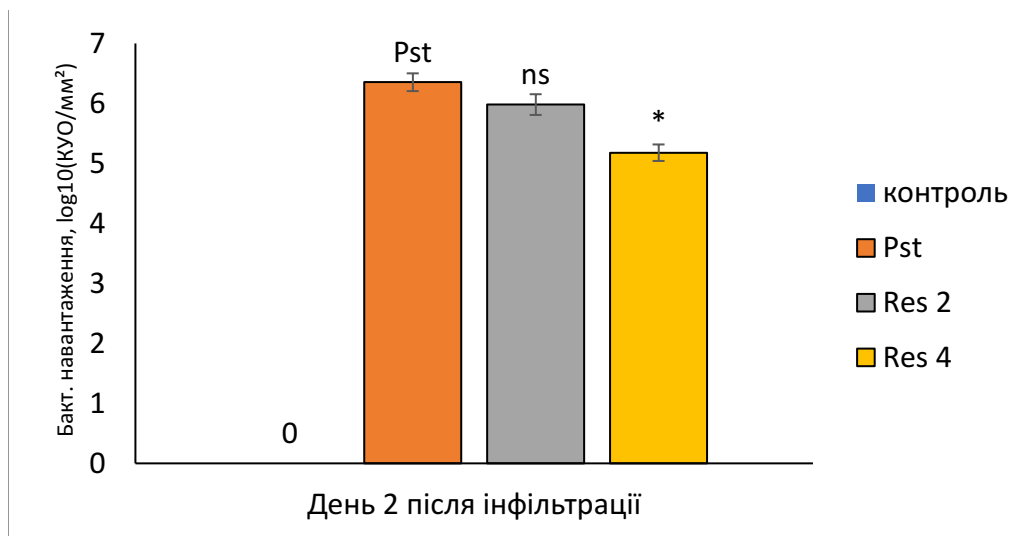


Рис. 6.3. Бактеріальне навантаження фагорезистентних штамів у ґрунтових рослинах *Ath nahG*. ns – незначне відхилення, \* -  $p < 0.1$

Ізолят Res4 погано розмножувався навіть в сприятливих до різних патогенів nahG-рослинах. Це підтвердило наші припущення стосовно того, що втрата нашими ізолятами чутливості до бактеріофагів стимулювала генетичні зміни, внаслідок яких бактерії стали менш інфекційними для рослини та стали погано розмножуватись в поживних середовищах. Такі зміни будуть цікаві і в контексті фаготерапії, адже зміна бактеріального метаболізму фагами може суттєво вплинути на варіанти і методи їх застосування.

Отже, отримані в ході досліджень фагорезистентні ізоляти представляють собою фундамент для досліджень взаємовідношення набуття стійкості до фагів і фізіологічних та метаболічних змін в бактеріальній клітині. Повногеномний аналіз даних ізолятів дозволить дізнатись детальну інформацію щодо того, які саме зміни відбулись в бактеріальному геномі.

## УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Фітопатогенні бактерії завдають значної шкоди рослинництву. Вони асоційовані з культурними і дикорослими видами рослин, спричинюють значні втрати у рослинництві, лісівництві, квітникарстві, суттєво знижують урожайність та якість продукції незалежно від регіону їх поширення (3). Пошук бактеріофагів, специфічних до збудників бактеріозів, які викликають хвороби важливих для сільського господарства культур рослин – актуальне завдання для України, сільськогосподарська галузь якої до сих пір лишається важливою для економіки як нашої держави, так і Європи. Згідно з нормами ЄС і вимогами до чистоти продуктів рослинництва від хімічно- та біологічно-активних речовин проти збудників фітобактеріозів рослин не рекомендовано використовувати антибіотики, тому пошук альтернативних засобів боротьби із бактеріозами є важливим завданням для науковців. Одним із найбільш ефективних і багатообіцяючих засобів боротьби із фітопатогенними мікроорганізмами є літичні, специфічні до збудника бактеріофаги (фаги).

Дослідження фагів націлені на найбільш поширені і шкодочинні збудники рослин. Незважаючи на активні дослідження щодо використання фагових продуктів проти бактеріозів рослин, практичне застосування таких знань все ще обмежене. Однією з причин такого обмеження є неоднорідність стратегій досліджень і відсутність загальноприйнятих протоколів для оцінки ефективності фагів у рослин. Крім того, більш глибоке дослідження впливу фагових суспензій і продуктів їх взаємодії з бактеріями на рослини, особливо на вроджену імунну систему рослин, необхідно для відкриття нових напрямків в лікуванні і профілактиці захворювань рослин.

На даний момент вплив фагів на імунітет рослин та фізіології майже не вивчений. Загальноприйнято, що фаги не взаємодіють безпосередньо з рослинами, тому вплив фагів на них лишається непоміченим. Дослідження викладених проблем є фундаментально важливим для розуміння процесів

взаємодії між фагами, бактеріями та рослинами, що є необхідним етапом у розвитку фаготерапії.

В останні роки в Україні почали приділяти увагу пошукам специфічних літичних бактеріофагів, які теоретично можна було б використовувати у складі фагових препаратів (44,175,176). Зацікавленість у пошуках фагів для лікування і профілактики бактеріозів сільськогосподарських рослин виникла як через надмірне використання антибіотиків на державних та приватних угіддях, так і через європейський геополітичний курс України, оскільки законами ЄС регламентовано уникати використання антибіотиків і підтримувати чистоту рослинної продукції від хімічного забруднення препаратами та добривами. Наразі існує лише декілька відомих комерційних препаратів, що застосовуються для лікування бактеріальної плямистості, викликаної *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *P. syringae* pv. *tomato*, *Clavivacter*, *Erwinia* – це «AgriPhage» компанії OmnyLytics (Іллінойс, США), «Пентафаг-С» (Україна) та «Biolyse®-PB» компанії APS BIOCONTROL (Сполучене Королівство, Шотландія). AgriPhage є натуральним, безпечним, ефективним лікарським засобом, що попереджає ураження шкочинними бактеріями рослин томатів та перцю, проте його склад вже давно є неактуальним в умовах постійної ко-еволюції фагів і їх бактерій. В Україні також було розроблено фаговий препарат під назвою ПЕНТАФАГ-С, який представляє собою суміш бактеріофагів невідомого спектру дії, проте так само, як AgriPhage, його склад застарів і ефективність з кожним роком прямує до нульової. Оновлення складів фагових препаратів, створення нових коктейлів є запорукою їх успішного використання.

Із овочів із симптомами фітобактеріозів та стічних нами було ізольовано 4 бактеріофага – потенційних кандидатів для створення фагових коктейлів. Нами було виділено та накопичено бактеріофаги, специфічні до *P. agglomerans* (попередньо виділеної з томатів із симптомами бактеріозу та

визначеною за допомогою селективних середовищ), *S. marcescens* та *P. syringae* pv. *tomato* DC 3000 (*Pst*) (обидві культури були взяті із лабораторних колекцій). Методами збагачення та подвійних агарових шарів було накопичено та очищено виділені віруси. Було проведено електронну мікроскопію вірусів, за результатами якої фаговий ізолят Eh1, специфічний до *P. agglomerans*, та фаг 4S, специфічний до *S. marcescens*, мають морфотипи, типові для міоподібних вірусів. Ізоляти бактеріофагів Eir4 та Eisa9, специфічні до *Pst*, мають типову морфологію подовірусів і за результатами генетичного аналізу належать до родини *Autographiviridae* (1). Геном фагу 4S було повністю секвеновано і завантажено до світового генетичного банку GenBank NCBI (accession number MW082584) (2). Результати порівняння з нуклеотидними послідовностями інших фагів, специфічних до *S. marcescens*, показали, що найближчим родичем бактеріофага *Serratia* phage 4S є фаг *Serratia* phage СВН8 (покриття склало 7%, ідентичність 76%). Результати філогенетичного аналізу МСР (головного капсидного білка) фага *Serratia* phage 4S показали, що його послідовність МСР була найбільш гомологічна до послідовностей МСР фагів *Acinetobacter* і *Enterobacter*. Філогенетичний аналіз послідовності ДНК-гелікази *Serratia* phage 4S показав, що вона найбільш гомологічна до послідовностей ДНК-гелікази фагів *Yersinia* і *Enterobacter*. Така подібність є очікуваною, оскільки такі збудники, як *Serratia* та *Enterobacter* є не тільки фітопатогенами, але й викликають опортуністичні захворювання у людей; цим же обумовлена велика кількість різних бактеріофагів, специфічних до них, у міських стічних водах. Наявність повногеномного сиквенсу цього фагу дає підстави для використання його у розробці тестових фагових препаратів.

Бактеріофаги Eir4 та Eisa9, специфічні до *Pst*, були перевірені на стійкість до різних температур та рН. Фаги лишалися стабільними за температури від 4°C (температура інкубації) до 26°C (температура для росту *Pst*) та за рН 7-9.

Динаміку взаємодії Eir4 та Eisa9 з *Pst* було досліджено на спектрофотометрі і виявлено, що фаг Eir4 має більшу літичну активність, оскільки повністю лізував бактерію в середовищі вже після 80 хвилин ко-інкубації, а Eisa9 - після 125 хвилин, при цьому утримуючи концентрацію бактерій на стабільному рівні, що свідчить про специфічні та відмінні від звичайних літичних фагів взаємовідносини з хазяїном. Фаг Eisa9 також не виявився ефективним проти *Pst in planta*. Ми пов'язали такі результати із наслідками специфічних взаємовідносин даного бактеріофага, які спостерігали при дослідженні їх динаміки в попередніх експериментах. Хоча даний фаг наразі не можна рекомендувати як кандидата в складові фагових препаратів, але він є досить цікавим генетично та біологічно, і потребує подальшої повної характеристики.

За результатами інокуляції арабідопсисів за методом інфільтрації обидва фага виявились неефективними в пригніченні росту *Pst*, оскільки її концентрація лишалась високою на рівні з бактеріальним контролем в усіх групах рослин, включно з інокульованими фагами. Лімітуючі чинники у внутрішньому середовищі рослини впливали на здатність фагів інфікувати бактерію, хоча віруси були виділені з інокульованих листків навіть через 4 доби після інокуляції. Отже, ми не можемо рекомендувати даний метод для оцінки ефективності фага *in planta* через лімітовану здатність вірусів інфікувати бактеріальні клітини всередині рослинного організму.

За результатами інокуляції десятиденних рослин арабідопсиса в рідкому MS середовищі (у 24-лункових плашках), фаг Eir4 успішно лімітував ріст *Pst* як в групах, оброблених сумішшю фаг-бактерія, так і в групах, де фаг був внесений за добу до інокуляції *Pst*. Метод інокуляції у рідкому середовищі виявився найбільш ефективним для дослідження ефективності фагів у пригніченні росту бактерій, швидким у порівнянні з іншими опрацьованими нами методами (час проведення експерименту до 12 днів) і може бути рекомендований, як універсальна методика.

Вплив ко-інфекції фага та бактерії *Pst* на імунну відповідь *A.thaliana* був досліджений за допомогою методу GUS-фарбування листків мутантів арабідопсису PR1::GUS та FRK1::GUS, інокульованих бактерією та сумішшю з фагом шляхом інфільтрації. Показано, що фаг не індукує синтез білків ранньої імунної відповіді *PR1* та *FRK1*, а суміш фага та бактерії могла викликати сильнішу відповідь за рахунок лізису бактерії або пошкодження листкової пластинки у випадку інфільтрації. При інокуляції у рідкому середовищі синтез *PR1* в рослин, оброблених сумішшю фага та бактерії, був значно менш інтенсивний за бактеріальний контроль, а у рослин, оброблених лише фагом, інтенсивність забарвлення статистично не відрізнялась від такої у рослин, інокульованих буфером 10 mM MgCl<sub>2</sub> (контроль). Індукцію синтезу *PR1* та *FRK1* у невеликих кількостях в рослинах, що були інокульовані фагом або сумішшю фага та бактерії можна пояснити утворенням продуктів процесу лізису та наявністю бактеріальних білків в лізаті бактеріофага. В цілому можемо говорити, що дану ланку імунітету фаги активувати не можуть, але опосередковано можуть впливати на посилення імунної відповіді у випадку взаємодії з бактерією.

В ході досліджень також були виділені стійкі до фагів Eir4 та Eisa9 ізоляти *Pst*. Ми спостерігали зміну здатності чотирьох штамів (Res1, Res2, Res3, Res4) до росту в умовах *in vitro* та *in planta*. Ізолят Res2 накопичувався в середовищі та в рослині в рази повільніше, ніж нормальна чутлива культура *Pst*, а ізолят Res4 при збереженні нормального росту в умовах *in vitro* демонстрував суттєво нижчі рівні інфекційності в рослині. Набуття стійкості до фагів цими ізолятами спровокувала зміни в бік зниження патогенності, деталі яких дозволить розкрити лише повногеномний аналіз резистентних штамів. За останні роки були роботи, в якії вказувалось на можливість набуття стійкості до фагів у бактерій за рахунок пригнічення інших їх властивостей та функцій (192).

В цілому, у ході дисертаційного дослідження було виконано роботу, що має фундаментальний теоретичний та практичний сенс. Виділені специфічні бактеріофаги за умови повної характеристики можуть бути використані в якості складових фагових препаратів за умови дотримання всіх рекомендованих правил обробки; підібрану методику інокуляції рослин фагами в лабораторних умовах можна використовувати для демонстрації ефективності вірусів і тестування їх інфекційності, а результати можуть бути обчислені статистично і принадні до порівняння. Результати проведеного дослідження з імунної відповіді рослин на ко-інфекцію є важливим етапом у фундаментальному розумінні процесів взаємодії фага та рослинного організму і необхідні для подальшого успішного використання фагів як терапевтичних агентів. Аналіз змін патогенності та здатності до росту бактерій внаслідок набуття резистентності до фагів є необхідним в контексті фаготерапії та дослідження впливу ко-інфекції на рослину.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі було проведено виділення та характеристику бактеріофагів, специфічних до поширених збудників фітобактеріозів, досліджені їх біологічні властивості, перевірено методик інокуляції фагами рослин та досліджено вплив фагів на первинну ланку імунної відповіді рослин.

Науково-практичні результати роботи представлені у наступних висновках:

- 1) Виділені ізоляти бактеріофагів Eh1 (*Pantoea agglomerans*), 4S (*Serratia marcescens*), Eisa9 та Eir4 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) є специфічними відносно своїх хазяїв, накопичуються у високих титрах (вище  $10^7$  БУО/мл) та за морфологічними характеристиками подібні до міо- та подоподібних фагів;
- 2) Молекулярний аналіз геному бактеріофагу *Serratia* phage 4S, показав 76% спорідненість з ДНК послідовністю фага *Serratia* phage СВН8. Отримана повногеномна послідовність фага задепоновано в базі даних геномів NCBI під номером MW082584;
- 3) Бактеріофаги Eh1 та 4S у концентрації  $10^7$  БУО/мл на 100% пригнічують розвиток патологічного процесу зумовленого *Pantoea agglomerans* і *Serratia marcescens in planta*, відповідно. Ці дані свідчать про антимікробний потенціал виділених ізолятів фагів;
- 4) В порівнянні з методами інфільтрації та флад-інокуляції, метод інокуляції у рідкому середовищі дає більш швидкі і точні результати, що дозволяє рекомендувати його як базовий метод первинної оцінки активності фагів;
- 5) Дослідження у потрійній системі фаг-бактерія-рослина свідчать на користь відсутності прямого впливу бактеріофагів Eisa9 та Eir4 на розвиток захисної відповіді рослин. Натомість, обробка рослин

сумішшю фага і *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* індукувала синтез GUS внаслідок активації промоторів *PR1* та *FRK1* так само інтенсивно, як у бактеріальному контролі, що вказує на опосередкований вплив фаголізатів на рослини;

- б) В процесі досліджень виявлено чотири стійкі до бактеріофагів Eir4 та Eisa9 ізоляти *P. syringae* pv. *tomato* DC 3000, які відрізняються за кінетикою росту та проявом патогенних властивостей (в бік зменшення проявів симптомів), що свідчить про залучення різних механізмів набуття резистентності до бактеріофагів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Korniienko N, Kharina A, Zrelavs N, Jindřichová B, Moravec T, Budzanivska I, et al. Isolation and Characterization of Two Lytic Phages Efficient Against Phytopathogenic Bacteria From *Pseudomonas* and *Xanthomonas* Genera. *Front Microbiol* [Internet]. 2022 [cited 2023 Jun 2];13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.853593>
2. Dukhno EA, Kornienko NO, Shybanov SR, Budzanivska IG, Kharina AV. Complete Genome Sequence of Serratia Phage 4S Isolated from Wastewater in Ukraine. *Biopolym Cell*. 2021;37(4):315–22.
3. Jones J, Jackson L, Balogh B, Obradovic A, Iriarte F, Momol M. Bacteriophages for Plant Disease Control \*. *Annu Rev Phytopathol*. 2007 Feb 1;45:245–62.
4. Bacteriophages : biology and applications (Book, 2005) [WorldCat.org] [Internet]. [cited 2021 Sep 9]. Available from: <https://www.worldcat.org/title/bacteriophages-biology-and-applications/oclc/56880238>
5. Stern A, Sorek R. The phage-host arms-race: Shaping the evolution of microbes. *Bioessays*. 2011 Jan;33(1):43–51.
6. Adriaenssens EM, Van Vaerenbergh J, Vandenneuvel D, Dunon V, Ceysens PJ, De Proft M, et al. T4-Related Bacteriophage LIMESTONE Isolates for the Control of Soft Rot on Potato Caused by ‘*Dickeya solani*’. Johnson EA, editor. *PLoS ONE*. 2012 Mar 7;7(3):e33227.
7. Carstens AB, Djurhuus AM, Kot W, Hansen LH. A novel six-phage cocktail reduces *Pectobacterium atrosepticum* soft rot infection in potato tubers under simulated storage conditions. *FEMS Microbiol Lett*. 2019 May 1;366(9):fnz101.

8. Lee S, Vu NT, Oh EJ, Rahimi-Midani A, Thi TN, Song YR, et al. Biocontrol of Soft Rot Caused by *Pectobacterium odoriferum* with Bacteriophage phiPccP-1 in Kimchi Cabbage. *Microorganisms*. 2021 Apr;9(4):779.
9. Buttner C, McAuliffe O, Ross RP, Hill C, O'Mahony J, Coffey A. Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 [cited 2021 May 18];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00034/full?fbclid=IwAR0DmnpnmDxX7Ac4h-vzIJBuj4GImyrD3OhWkBWexYpyvd-hZhzzKaUJVk>
10. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*. 2011;1(2):66–85.
11. Essais de thérapeutique au moyen du bacteriophage – ScienceOpen [Internet]. [cited 2021 Sep 7]. Available from: <https://www.scienceopen.com/document?vid=f9178fff-aba9-440f-a4dd-1316136e86a7>
12. DAVISON WC. THE BACTERIOLYSANT THERAPY OF BACILLARY DYSENTERY IN CHILDREN: THERAPEUTIC APPLICATION OF BACTERIOLYSANTS; D'HERELLE'S PHENOMENON. *Am J Dis Child*. 1922 Jun 1;23(6):531–4.
13. Morison J. Bacteriophage in the Treatment and Prevention of Cholera. *Bacteriophage Treat Prev Cholera* [Internet]. 1932 [cited 2021 Sep 7]; Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19332900379>
14. Moore ES. D'Herelle's bacteriophage in relation to plant parasites. *South Afr J Sci*. 1926 Dec 1;23(12):306.

15. Isolation of an Inhibitory Substance from Plants - NALDC [Internet]. [cited 2021 Sep 7]. Available from: <https://naldc.nal.usda.gov/catalog/IND43966880>
16. Kotila JE, Coons GH, Michigan State College, Agricultural Experiment Station, Botanical Section. Investigations on the blackleg disease of potatoes. 1925.
17. Jones J, Jackson L, Balogh B, Obradovic A, Iriarte F, Momol M. Bacteriophages for Plant Disease Control \*. *Annu Rev Phytopathol.* 2007 Feb 1;45:245–62.
18. Knight RL, Clouston TW. The genetics of blackarm resistance. *J Genet.* 1939 Jul 1;38(1):133–59.
19. Okabe N, Goto M. Bacteriophages of Plant Pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 1963;1(1):397–418.
20. Fundamentals of bacterial plant pathology [Internet]. [cited 2021 Sep 9]. Available from: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2016079072>
21. He DC, He MH, Amalin DM, Liu W, Alvindia DG, Zhan J. Biological Control of Plant Diseases: An Evolutionary and Eco-Economic Consideration. *Pathogens.* 2021 Oct 12;10(10):1311.
22. Monk AB, Rees CD, Barrow P, Hagens S, Harper DR. Bacteriophage applications: where are we now? *Lett Appl Microbiol.* 2010 Oct;51(4):363–9.
23. Rohwer F, Edwards R. The Phage Proteomic Tree: a Genome-Based Taxonomy for Phage. *J Bacteriol.* 2002 Aug;184(16):4529–35.
24. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. - Abstract - Europe PMC [Internet]. [cited 2021 Sep 9]. Available from: <http://europepmc.org/article/PMC/PMC26759>

25. Weinbauer MG. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev.* 2004 May;28(2):127–81.
26. Zhu Y, Shang J, Peng C, Sun Y. Phage family classification under Caudoviricetes: a review of current tools using the latest ICTV classification framework [Internet]. arXiv; 2022 [cited 2023 Jun 2]. Available from: <http://arxiv.org/abs/2209.01942>
27. Hagens S, Loessner MJ. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007 Sep;76(3):513–9.
28. Zink R, Loessner MJ. Classification of virulent and temperate bacteriophages of *Listeria* spp. on the basis of morphology and protein analysis. *Appl Environ Microbiol.* 1992 Jan;58(1):296–302.
29. Bacteriophage: Therapeutic Uses - Harper - - Major Reference Works - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2021 Sep 9]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470015902.a0020000.pu> b2
30. Inal JM. Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2003;51(4):237–44.
31. Figueroa-Bossi N, Uzzau S, Maloriol D, Bossi L. Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol Microbiol.* 2001;39(2):260–72.
32. Boyd EF, Brüssow H. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol.* 2002 Nov;10(11):521–9.
33. Boyd EF, Davis BM, Hochhut B. Bacteriophage-bacteriophage interactions in the evolution of pathogenic bacteria. *Trends Microbiol.* 2001 Mar;9(3):137–44.

34. Fuhrman JA. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*. 1999 Jun;399(6736):541–8.
35. Ripp S, Miller RV. Dynamics of the pseudolysogenic response in slowly growing cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Read Engl*. 1998 Aug;144 ( Pt 8):2225–32.
36. Pinheiro LAM, Pereira C, Barreal ME, Gallego PP, Balcão VM, Almeida A. Use of phage  $\phi 6$  to inactivate *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit plants: in vitro and ex vivo experiments. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020 Feb;104(3):1319–30.
37. Pinheiro LAM, Pereira C, Frazão C, Balcão VM, Almeida A. Efficiency of Phage  $\phi 6$  for Biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: An in Vitro Preliminary Study. *Microorganisms*. 2019 Sep;7(9):286.
38. Yin Y, Ni P, Deng B, Wang S, Xu W, Wang D. Isolation and characterisation of phages against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Acta Agric Scand Sect B — Soil Plant Sci*. 2019 Apr 3;69(3):199–208.
39. Song YR, Vu NT, Park J, Hwang IS, Jeong HJ, Cho YS, et al. Phage PPPL-1, A New Biological Agent to Control Bacterial Canker Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Kiwifruit. *Antibiotics*. 2021 May;10(5):554.
40. Rombouts S, Volckaert A, Venneman S, Declercq B, Vandenneuvel D, Allonsius CN, et al. Characterization of Novel Bacteriophages for Biocontrol of Bacterial Blight in Leek Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *porri*. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [cited 2021 May 19];7. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00279/full>

41. Tian C, Zhao J, Zhang Z, Chen X, Wei X, Li H, et al. Identification and molecular characterization of *Serratia marcescens* phages vB\_SmaA\_2050H1 and vB\_SmaM\_2050HW. *Arch Virol*. 2019 Apr;164(4):1085–94.
42. Matsushita K, Uchiyama J, Kato S ichiro, Ujihara T, Hoshiba H, Sugihara S, et al. Morphological and genetic analysis of three bacteriophages of *Serratia marcescens* isolated from environmental water. *FEMS Microbiol Lett*. 2009 Feb 1;291(2):201–8.
43. Graham K, Freeman M, Newkirk H, Liu M, Cahill J, Ramsey J. Complete Genome Sequence of *Serratia marcescens* Phage MTx. *Microbiol Resour Announc*. 8(25):e00573-19.
44. Kharina A, Kornienko N, Stavniychuk A, Kot T, Liptuga M. Isolation of bacteriophages, capable to lyse *Serratia marcescens* and evaluation of their activity on onion and geranium. *Bull Taras Shevchenko Natl Univ Kyiv Ser Biol*. 2016 Jan 1;72:89–91.
45. Adriaenssens EM, Ceysens PJ, Dunon V, Ackermann HW, Van Vaerenbergh J, Maes M, et al. Bacteriophages LIMELight and LIMEzero of *Pantoea agglomerans*, Belonging to the “phiKMV-Like Viruses”. *Appl Environ Microbiol*. 2011 May 15;77(10):3443–50.
46. Born Y, Fieseler L, Marazzi J, Lurz R, Duffy B, Loessner MJ. Novel Virulent and Broad-Host-Range *Erwinia amylovora* Bacteriophages Reveal a High Degree of Mosaicism and a Relationship to Enterobacteriaceae Phages. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Sep 1;77(17):5945–54.
47. Lacy GH. Perspectives for Biological Engineering of Prokaryotes for Biological Control of Weeds. In: TeBeest DO, editor. *Microbial Control of Weeds* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 1991 [cited 2022 Jun 14]. p. 135–51. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9680-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9680-6_8)

48. Hacker J, Kaper JB. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:641–79.
49. Syvanen M, Kado CI. *Horizontal Gene Transfer.* Academic Press; 2001. 475 p.
50. Buonauro R. Infection and plant defense responses during plant-bacterial interaction. *Plant-Microbe Interact.* 2008;169–97.
51. Fuchs TM. Molecular mechanisms of bacterial pathogenicity. *Naturwissenschaften.* 1998 Mar;85(3):99–108.
52. Agrios GN. *Plant Pathology.* Elsevier; 2005. 947 p.
53. Dodd CER. PSEUDOMONAS | Introduction. In: *Encyclopedia of Food Microbiology* [Internet]. Elsevier; 2014 [cited 2021 Sep 9]. p. 244–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123847300002822>
54. Agrios GN. *Plant pathology.* San Diego: Academic Press; 1997.
55. Hirano SS, Upper CD. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* 2000 Sep;64(3):624–53.
56. Gardan L, Shafik H, Belouin S, Broch R, Grimont F, Grimont PADY 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *Int J Syst Evol Microbiol.* 1999;49(2):469–78.
57. Klement Z. RAPID DETECTION OF THE PATHOGENICITY OF PHYTOPATHOGENIC PSEUDOMONADS. *Nature.* 1963 Jul 20;199:299–300.

58. Bent AF. Plant Disease Resistance Genes: Function Meets Structure. *Plant Cell*. 1996 Oct;8(10):1757–71.
59. Greenberg JT. Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 29;93(22):12094–7.
60. Dangl JL, Dietrich RA, Richberg MH. Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions. *Plant Cell*. 1996 Oct;8(10):1793–807.
61. Hammond-Kosack KE, Jones JDG. PLANT DISEASE RESISTANCE GENES. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1997 Jun;48:575–607.
62. Dong X, Mindrinos M, Davis KR, Ausubel FM. Induction of Arabidopsis defense genes by virulent and avirulent *Pseudomonas syringae* strains and by a cloned avirulence gene. *Plant Cell*. 1991 Jan;3(1):61–72.
63. Whalen MC, Innes RW, Bent AF, Staskawicz BJ. Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of Arabidopsis and a bacterial locus determining avirulence on both Arabidopsis and soybean. *Plant Cell*. 1991 Jan;3(1):49–59.
64. Keen NT. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu Rev Genet*. 1990;24:447–63.
65. Block A, Alfano JR. Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Curr Opin Microbiol*. 2011 Feb;14(1):39–46.
66. Boch J, Bonas U. Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annu Rev Phytopathol*. 2010;48(1):419–36.

67. Boller T, He SY. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*. 2009 May 8;324(5928):742–4.
68. Dou D, Zhou JM. Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. *Cell Host Microbe*. 2012 Oct 18;12(4):484–95.
69. Grant SR, Fisher EJ, Chang JH, Mole BM, Dangl JL. Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2006;60:425–49.
70. Lewis JD, Guttman DS, Desveaux D. The targeting of plant cellular systems by injected type III effector proteins. *Semin Cell Dev Biol*. 2009 Dec;20(9):1055–63.
71. Mudgett MB. New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2005;56:509–31.
72. Lindeberg M, Cartinhour S, Myers CR, Schechter LM, Schneider DJ, Collmer A. Closing the circle on the discovery of genes encoding Hrp regulon members and type III secretion system effectors in the genomes of three model *Pseudomonas syringae* strains. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI*. 2006 Nov;19(11):1151–8.
73. Cunnac S, Lindeberg M, Collmer A. *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Curr Opin Microbiol*. 2009 Feb;12(1):53–60.
74. Buell CR, Joardar V, Lindeberg M, Selengut J, Paulsen IT, Gwinn ML, et al. The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 2;100(18):10181–6.

75. Alfano JR, Charkowski AO, Deng WL, Badel JL, Petnicki-Ocwieja T, Dijk K van, et al. The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proc Natl Acad Sci*. 2000 Apr 25;97(9):4856–61.
76. Kvitko BH, Park DH, Velásquez AC, Wei CF, Russell AB, Martin GB, et al. Deletions in the repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 type III secretion effector genes reveal functional overlap among effectors. *PLoS Pathog*. 2009 Apr;5(4):e1000388.
77. Priest FG. Systematics and Ecology of *Bacillus*. In: *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 1993 [cited 2021 Sep 9]. p. 1–16. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555818388.ch1>
78. Besler KR, Little EL. Diversity of *Serratia marcescens* Strains Associated with Cucurbit Yellow Vine Disease in Georgia. *Plant Dis*. 2017 Jan;101(1):129–36.
79. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*. 1999 Oct;5(5):607–25.
80. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2004 Aug 1;39(3):309–17.
81. Jha AK, Bais HP, Vivanco JM. *Enterococcus faecalis* Mammalian Virulence-Related Factors Exhibit Potent Pathogenicity in the *Arabidopsis thaliana* Plant Model. *Infect Immun*. 2005 Jan;73(1):464–75.

82. Wang SA, Tokars JI, Bianchine PJ, Carson LA, Arduino MJ, Smith AL, et al. *Enterobacter cloacae* bloodstream infections traced to contaminated human albumin. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2000 Jan;30(1):35–40.
83. Sikora EJ, Bruton BD, Wayadande AC, Fletcher J. First Report of the Cucurbit Yellow Vine Disease Caused by *Serratia marcescens* in Watermelon and Yellow Squash in Alabama. *Plant Dis*. 2012 May;96(5):761.
84. Gillis A, Rodríguez M, Santana MA. *Serratia marcescens* associated with bell pepper (*Capsicum annuum* L.) soft-rot disease under greenhouse conditions. *Eur J Plant Pathol*. 2014 Jan 1;138(1):1–8.
85. Wang XQ, Bi T, Li XD, Zhang LQ, Lu SE. First Report of Corn Whorl Rot Caused by *Serratia marcescens* in China. *J Phytopathol*. 2015;163(11–12):1059–63.
86. Ignatov AN, Khodykina MV, Polityko VA, Sukhacheva MV. First report of *Serratia marcescens* causing yellow wilt disease on sunflower in Russia. *New Dis Rep*. 2016;33(1):8–8.
87. Schappe T, Ritchie DF, Thiessen LD. First Report of *Serratia marcescens* Causing a Leaf Spot Disease on Industrial Hemp (*Cannabis sativa*). *Plant Dis*. 2020 Apr 1;104(4):1248.
88. G W, J.w K, S T. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology* [Internet]. 1996 [cited 2021 Sep 9]; Available from: [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Induced+systemic+resistance+to+cucumber+diseases+and+increased+plant+growth+by+plant+growth-promoting+rhizobacteria+under+field+conditions.&author=Wei+G.&publication\\_year=1996](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Induced+systemic+resistance+to+cucumber+diseases+and+increased+plant+growth+by+plant+growth-promoting+rhizobacteria+under+field+conditions.&author=Wei+G.&publication_year=1996)

89. Panstruga R, Dodds PN. Terrific Protein Traffic: The Mystery of Effector Protein Delivery by Filamentous Plant Pathogens. *Science*. 2009 May 8;324(5928):748–50.
90. Coutinho TA, Preisig O, Mergaert J, Cnockaert MC, Riedel KH, Swings J, et al. Bacterial Blight and Dieback of Eucalyptus Species, Hybrids, and Clones in South Africa. *Plant Dis*. 2002 Jan;86(1):20–5.
91. Cruz AT, Cazacu AC, Allen CH. *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *J Clin Microbiol*. 2007 Jun;45(6):1989–92.
92. Masyahit M, Sijam K, Awang Y, Ghazali M, Satar M. First Report on Bacterial Soft Rot Disease on Dragon Fruit (*Hylocereus* spp.) Caused by *Enterobacter cloacae* in Peninsular Malaysia. *Int J Agric Biol*. 2009 Nov 1;11:1560–8530.
93. Koutsoudis MD, Tsaltas D, Minogue TD, Bodman SB von. Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *Proc Natl Acad Sci*. 2006 Apr 11;103(15):5983–8.
94. Marín-Cevada V, Vargas VH, Juárez M, López VG, Zagada G, Hernández S, et al. Presence of *Pantoea citrea*, causal agent of pink disease, in pineapple fields in Mexico. *Plant Pathol* [Internet]. 2006 [cited 2021 Sep 9];55(2). Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20063095922>
95. Goszczynska T, Botha WJ, Venter SN, Coutinho TA. Isolation and Identification of the Causal Agent of Brown Stalk Rot, A New Disease of Maize in South Africa. *Plant Dis*. 2007 Jun 1;91(6):711–8.
96. Cother E, Reinke R, McKenzie C, Lanoiselet V, Noble D. An unusual stem necrosis of rice caused by *Pantoea ananas* and the first record of this pathogen

on rice in Australia. *Australas Plant Pathol - AUSTRALAS PLANT PATHOL.* 2004 Dec 1;33:495–503.

97. Alfano J, Collmer A. Alfano, J. R. & Collmer, A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 385-414. *Annu Rev Phytopathol.* 2004 Feb 1;42:385–414.
98. Weinthal D, Yablonski S, Singer S, Barash I, Manulis-Sasson S, Gaba V. The type III effector PthG of *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophilae* modifies host plant responses to auxin, cytokinin and light. *Eur J Plant Pathol.* 2010 Nov 1;128:289–302.
99. Maki DG, Rhame FS, Mackel DC, Bennett JV. Nationwide epidemic of septicemia caused by contaminated intravenous products. I. Epidemiologic and clinical features. *Am J Med.* 1976 Apr;60(4):471–85.
100. Matsaniotis NS, Syriopoulou VP, Theodoridou MC, Tzanetou KG, Mostrou GI. Enterobacter sepsis in infants and children due to contaminated intravenous fluids. *Infect Control IC.* 1984 Oct;5(10):471–7.
101. Alvarez FE, Rogge KJ, Tarrand J, Lichtiger B. Bacterial contamination of cellular blood components. A retrospective review at a large cancer center. *Ann Clin Lab Sci.* 1995 Aug;25(4):283–90.
102. Bennett SN, McNeil MM, Bland LA, Arduino MJ, Villarino ME, Perrotta DM, et al. Postoperative infections traced to contamination of an intravenous anesthetic, propofol. *N Engl J Med.* 1995 Jul 20;333(3):147–54.
103. Habsah H, Zeehaida M, Van Rostenberghe H, Noraida R, Wan Pauzi WI, Fatimah I, et al. An outbreak of *Pantoea* spp. in a neonatal intensive care unit

- secondary to contaminated parenteral nutrition. *J Hosp Infect.* 2005 Nov;61(3):213–8.
104. Bicudo EL, Macedo VO, Carrara MA, Castro FFS, Rage RI. Nosocomial outbreak of *Pantoea agglomerans* in a pediatric urgent care center. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis.* 2007 Apr;11(2):281–4.
105. Flatauer FE, Khan MA. Septic arthritis caused by *Enterobacter agglomerans*. *Arch Intern Med.* 1978 May;138(5):788.
106. De Champs C, Le Seaux S, Dubost JJ, Boisgard S, Sauvezie B, Sirot J. Isolation of *Pantoea agglomerans* in Two Cases of Septic Monoarthritis after Plant Thorn and Wood Sliver Injuries. *J Clin Microbiol.* 2000 Jan;38(1):460–1.
107. Kratz A, Greenberg D, Barki Y, Cohen E, Lifshitz M. *Pantoea agglomerans* as a cause of septic arthritis after palm tree thorn injury; case report and literature review. *Arch Dis Child.* 2003 Jun;88(6):542–4.
108. Schmid H, Schubert S, Weber C, Bogner JR. Isolation of a *Pantoea dispersa*-like strain from a 71-year-old woman with acute myeloid leukemia and multiple myeloma. *Infection.* 2003 Jan;31(1):66–7.
109. Fluit AC, Schmitz FJ, Verhoef J, European SENTRY Participant Group. Frequency of isolation of pathogens from bloodstream, nosocomial pneumonia, skin and soft tissue, and urinary tract infections occurring in European patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2001 Mar;20(3):188–91.
110. Плямистість бактеріальна чорна (перець, томати) - Повний опис та перелік фунгіцидів від хвороби [Internet]. *Superagronom.com.* 2019 [cited 2021 Sep 23]. Available from: <https://superagronom.com/hvorobi-bakteriya/plyamistist-bakterialna-chorna-perets-tomati-id16386>

111. Чорна ніжка (картопля) - Повний опис та перелік фунгіцидів від хвороби [Internet]. Superagronom.com. 2019 [cited 2021 Sep 23]. Available from: <https://superagronom.com/hvorobi-bakteriya/chorna-nijka-kartoplya-id16398>
112. Torre AL, Iovino V, Caradonia F. Copper in plant protection: current situation and prospects. *Phytopathol Mediterr*. 2018 Sep 17;57(2):201–36.
113. Sundin GW, Wang N. Antibiotic Resistance in Plant-Pathogenic Bacteria. *Annu Rev Phytopathol*. 2018 Aug 25;56:161–80.
114. Tancos KA, Cox KD. Exploring Diversity and Origins of Streptomycin-Resistant *Erwinia amylovora* Isolates in New York Through CRISPR Spacer Arrays. *Plant Dis*. 2016 Jul;100(7):1307–13.
115. Xu Y, Luo Q, Zhou M, Guo. Identification and Characterization of Integron-Mediated Antibiotic Resistance in the Phytopathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *PLOS ONE*. 2013 Feb 21;8(2):e55962.
116. Koh HS, Kim GH, Lee YS, Koh YJ, Jung JS. Molecular Characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Strains Isolated in Korea and a Multiplex PCR Assay for Haplotype Differentiation. *Plant Pathol J*. 2014;30(1):96–101.
117. Bender CL, Cooksey DA. Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: conjugative transfer and role in copper resistance. *J Bacteriol*. 1986 Feb;165(2):534–41.
118. Costa MB, Tavares FV, Martinez CB, Colares IG, Martins C de MG. Accumulation and effects of copper on aquatic macrophytes *Potamogeton pectinatus* L.: Potential application to environmental monitoring and phytoremediation. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2018 Jul 15;155:117–24.

119. Stern BR. Essentiality and toxicity in copper health risk assessment: overview, update and regulatory considerations. *J Toxicol Environ Health A*. 2010;73(2):114–27.
120. Roychoudhury S, Nath S, Massanyi P, Stawarz R, Kacaniova M, Kolesarova A. Copper-induced changes in reproductive functions: in vivo and in vitro effects. *Physiol Res*. 2016;65(1):11–22.
121. Navarro JA, Schneuwly S. Copper and Zinc Homeostasis: Lessons from *Drosophila melanogaster*. *Front Genet*. 2017;8:223.
122. Cao Q, Steinman AD, Wan X, Xie L. Combined toxicity of microcystin-LR and copper on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Chemosphere*. 2018 Sep;206:474–82.
123. Rajput V, Minkina T, Fedorenko A, Sushkova S, Mandzhieva S, Lysenko V, et al. Toxicity of copper oxide nanoparticles on spring barley (*Hordeum sativum distichum*). *Sci Total Environ*. 2018 Dec 15;645:1103–13.
124. Abbasi PA, Khabbaz SE, Weselowski B, Zhang L. Occurrence of copper-resistant strains and a shift in *Xanthomonas* spp. causing tomato bacterial spot in Ontario. *Can J Microbiol*. 2015 Oct;61(10):753–61.
125. Zhang S, Fu Y, Mersha Z, Pernezny K. Assessment of copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the pathogen of halo blight on snap bean. *Crop Prot*. 2017 Aug 1;98:8–15.
126. Howard-Varona C, Hargreaves KR, Abedon ST, Sullivan MB. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *ISME J*. 2017 Jul;11(7):1511–20.
127. Taylor VL, Fitzpatrick AD, Islam Z, Maxwell KL. The Diverse Impacts of Phage Morons on Bacterial Fitness and Virulence. *Adv Virus Res*. 2019;103:1–31.

128. Balogh B. STRATEGIES FOR IMPROVING THE EFFICACY OF BACTERIOPHAGES FOR CONTROLLING BACTERIAL SPOT OF TOMATO. undefined [Internet]. 2002 [cited 2021 Sep 9]; Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/STRATEGIES-FOR-IMPROVING-THE-EFFICACY-OF-FOR-SPOT-Balogh/d7b7d61676ec687e46fdabb70f197213a109a5c9>
129. Czajkowski R, Ozymko Z, Lojkowska E. Isolation and characterization of novel soilborne lytic bacteriophages infecting *Dickeya* spp. biovar 3 ('*D. solani*'). *Plant Pathol.* 2014;63(4):758–72.
130. Zaczek-Moczydłowska MA, Young GK, Trudgett J, Plahe C, Fleming CC, Campbell K, et al. Phage cocktail containing Podoviridae and Myoviridae bacteriophages inhibits the growth of *Pectobacterium* spp. under in vitro and in vivo conditions. *PLOS ONE.* 2020 Apr 2;15(4):e0230842.
131. Lim JA. Biocontrol of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Using Bacteriophage PP1. *J Microbiol Biotechnol.* 2013 Aug 28;23(8):1147–53.
132. Boulé J, Sholberg PL, Lehman SM, O’gorman DT, Svircev AM. Isolation and characterization of eight bacteriophages infecting *Erwinia amylovora* and their potential as biological control agents in British Columbia, Canada. *Can J Plant Pathol.* 2011 Jul 1;33(3):308–17.
133. McKenna F, El-Tarabily KA, Hardy GESJ, Dell B. Novel in vivo use of a polyvalent *Streptomyces* phage to disinfest *Streptomyces scabies*-infected seed potatoes. *Plant Pathol.* 2001;50(6):666–75.
134. Goyer C. Isolation and characterization of phages Stsc1 and Stsc3 infecting *Streptomyces scabiei* and their potential as biocontrol agents. *Can J Plant Pathol.* 2005 Jun;27(2):210–6.

- 135.Sharma RS, Karmakar S, Kumar P, Mishra V. Application of filamentous phages in environment: A tectonic shift in the science and practice of ecorestoration. *Ecol Evol.* 2019;9(4):2263–304.
- 136.Gašić K, Kuzmanović N, Ivanović M, Prokić A, Šević M, Obradović A. Complete Genome of the *Xanthomonas euvesicatoria* Specific Bacteriophage KΦ1, Its Survival and Potential in Control of Pepper Bacterial Spot. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 [cited 2021 May 19];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02021/full>
- 137.Lang JM, Gent DH, Schwartz HF. Management of *Xanthomonas* Leaf Blight of Onion with Bacteriophages and a Plant Activator. *Plant Dis.* 2007 Jul;91(7):871–8.
- 138.Addy H, Askora A, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T. Utilization of Filamentous Phage RSM3 to Control Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Dis.* 2012 Aug 1;96:1204–9.
- 139.Fujiwara A, Fujisawa M, Hamasaki R, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T. Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by Treatment with Lytic Bacteriophages. *Appl Environ Microbiol.* 2011 Jun 15;77(12):4155–62.
- 140.Ramírez M, Neuman BW, Ramírez CA. Bacteriophages as promising agents for the biological control of Moko disease (*Ralstonia solanacearum*) of banana. *Biol Control.* 2020 Oct;149:104238.
- 141.Umrao PD, Kumar V, Kaistha SD. Biocontrol potential of bacteriophage  $\phi$ sp1 against bacterial wilt-causing *Ralstonia solanacearum* in Solanaceae crops. *Egypt J Biol Pest Control.* 2021 Dec;31(1):61.
- 142.Frampton RA, Pitman AR, Fineran PC. Advances in Bacteriophage-Mediated Control of Plant Pathogens. *Int J Microbiol* [Internet]. 2012 [cited 2021 May

19];2012.

Available

from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3426239/>

143. Nagy JK, Király L, Schwarczinger I. Phage therapy for plant disease control with a focus on fire blight. *Cent Eur J Biol*. 2012 Feb 1;7(1):1–12.
144. Park J, Lee GM, Kim D, Park DH, Oh CS. Characterization of the Lytic Bacteriophage phiEaP-8 Effective against Both *Erwinia amylovora* and *Erwinia pyrifoliae* Causing Severe Diseases in Apple and Pear. *Plant Pathol J*. 2018 Oct;34(5):445–50.
145. Ravensdale M, Blom T, Gracia-Garza J, Smith R. Bacteriophages and the control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Can J Plant Pathol-Rev Can Phytopathol - CAN J PLANT PATHOL*. 2007 Jun 1;29:121–30.
146. Stonier T, McSharry J, Speitel T. *Agrobacterium tumefaciens* Conn IV. Bacteriophage PB21 and Its Inhibitory Effect on Tumor Induction. *J Virol*. 1967 Apr;1(2):268–73.
147. Zimmerer RP, Hamilton RH, Pootjes C. Isolation and Morphology of Temperate *Agrobacterium tumefaciens* Bacteriophage 1. *J Bacteriol*. 1966 Sep;92(3):746–50.
148. Akbaba M, Ozaktan H. Evaluation of bacteriophages in the biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from cankers on sweet cherry (*Prunus avium* L.) in Turkey. *Egypt J Biol Pest Control*. 2021 Feb 18;31(1):35.
149. Kim MH. Bacteriophages of *Pseudomonas tolaasii* for the Biological Control of Brown Blotch Disease. *J Korean Soc Appl Biol Chem* [Internet]. 2011 Feb 28 [cited 2021 May 19];54(1). Available from: <http://link.springer.com/10.3839/jksabc.2011.014>

150. Obradovic A, Jones JB, Momol MT, Balogh B, Olson SM. Management of Tomato Bacterial Spot in the Field by Foliar Applications of Bacteriophages and SAR Inducers. *Plant Dis.* 2004 Jul;88(7):736–40.
151. Ranjani P, Gowthami Y, Gnanamanickam S, Palani P. Bacteriophages: A New Weapon for the Control of Bacterial Blight Disease in Rice Caused by *Xanthomonas oryzae*. *Microbiol Biotechnol Lett.* 2018 Dec 28;46(4):346–59.
152. Balogh B, Canteros BI, Stall RE, Jones JB. Control of Citrus Canker and Citrus Bacterial Spot with Bacteriophages. *Plant Dis.* 2008 Jul;92(7):1048–52.
153. Rabiey M, Roy SR, Holtappels D, Franceschetti L, Quilty BJ, Creeth R, et al. Phage biocontrol to combat *Pseudomonas syringae* pathogens causing disease in cherry. *Microb Biotechnol.* 2020;13(5):1428–45.
154. Lallo GD, Evangelisti M, Mancuso F, Ferrante P, Marcelletti S, Tinari A, et al. Isolation and partial characterization of bacteriophages infecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, causal agent of kiwifruit bacterial canker. *J Basic Microbiol.* 2014;54(11):1210–21.
155. Morella NM, Zhang X, Koskella B. Tomato Seed-Associated Bacteria Confer Protection of Seedlings Against Foliar Disease Caused by *Pseudomonas syringae*. *Phytobiomes J.* 2019 Jan;3(3):177–90.
156. Hernandez CA, Salazar AJ, Koskella B. Bacteriophage-Mediated Reduction of Bacterial Speck on Tomato Seedlings. *PHAGE.* 2020 Dec 1;1(4):205–12.
157. Das M, Bhowmick TS, Ahern SJ, Young R, Gonzalez CF. Control of Pierce's Disease by Phage. Rashed A, editor. *PLOS ONE.* 2015 Jun 24;10(6):e0128902.
158. Williamson KE, Fuhrmann JJ, Wommack KE, Radosevich M. Viruses in Soil Ecosystems: An Unknown Quantity Within an Unexplored Territory. *Annu Rev Virol.* 2017 Sep 29;4(1):201–19.

159. Pratama AA, Terpstra J, de Oliveria ALM, Salles JF. The Role of Rhizosphere Bacteriophages in Plant Health. *Trends Microbiol.* 2020 Sep 1;28(9):709–18.
160. O'Brien S, Kümmerli R, Paterson S, Winstanley C, Brockhurst MA. Transposable temperate phages promote the evolution of divergent social strategies in *Pseudomonas aeruginosa* populations. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2019 Oct 9;286(1912):20191794.
161. Starr EP, Nuccio EE, Pett-Ridge J, Banfield JF, Firestone MK. Metatranscriptomic reconstruction reveals RNA viruses with the potential to shape carbon cycling in soil. *Proc Natl Acad Sci.* 2019 Dec 17;116(51):25900–8.
162. Braga LPP, Spor A, Kot W, Breuil MC, Hansen LH, Setubal JC, et al. Impact of phages on soil bacterial communities and nitrogen availability under different assembly scenarios. *Microbiome.* 2020 Apr 6;8(1):52.
163. Morella NM, Gomez AL, Wang G, Leung MS, Koskella B. The impact of bacteriophages on phyllosphere bacterial abundance and composition. *Mol Ecol.* 2018;27(8):2025–38.
164. Brockhurst MA, Fenton A, Roulston B, Rainey PB. The impact of phages on interspecific competition in experimental populations of bacteria. *BMC Ecol.* 2006 Dec 13;6:19.
165. Weitz JS, Wilhelm SW. Ocean viruses and their effects on microbial communities and biogeochemical cycles. *F1000Prime Rep [Internet].* 2012 Sep 5 [cited 2021 Aug 23];4(17). Available from: <https://facultyopinions.com/prime/reports/b/4/17/>

- 166.Koskella B, Brockhurst MA. Bacteria–phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *Fems Microbiol Rev.* 2014 Sep;38(5):916–31.
- 167.Hernandez CA, Koskella B. Phage resistance evolution in vitro is not reflective of in vivo outcome in a plant-bacteria-phage system\*. *Evolution.* 2019;73(12):2461–75.
- 168.Kutter E, De Vos D, Gvasalia G, Alavidze Z, Gogokhia L, Kuhl S, et al. Phage Therapy in Clinical Practice: Treatment of Human Infections. *Curr Pharm Biotechnol.* 2010 Jan 1;11(1):69–86.
- 169.Ibrahim YE, Saleh AA, Al-Saleh MA. Management of Asiatic Citrus Canker Under Field Conditions in Saudi Arabia Using Bacteriophages and Acibenzolar-S-Methyl. *Plant Dis.* 2017 Jan 9;101(5):761–5.
- 170.Obradovic A, Jones J, Momol M, Olson S, Jackson L, Balogh B, et al. Integration of Biological Control Agents and Systemic Acquired Resistance Inducers Against Bacterial Spot on Tomato. *Plant Dis - PLANT DIS.* 2005 Jul 1;89:712–6.
- 171.Iriarte FB, Obradović A, Wernsing MH, Jackson LE, Balogh B, Hong JA, et al. Soil-based systemic delivery and phyllosphere in vivo propagation of bacteriophages. *Bacteriophage.* 2012 Oct 1;2(4):e23530.
- 172.Kolozsváriné Nagy J, Schwarczinger I, Künstler A, Pogány M, Király L. Penetration and translocation of *Erwinia amylovora*-specific bacteriophages in apple - a possibility of enhanced control of fire blight. *Eur J Plant Pathol.* 2015 Aug 1;142(4):815–27.
- 173.Papaianni M, Paris D, Woo SL, Fulgione A, Rigano MM, Parrilli E, et al. Plant Dynamic Metabolic Response to Bacteriophage Treatment After *Xanthomonas*

- campestris pv. campestris Infection. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 [cited 2021 Aug 5];0. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00732/full>
174. Pernezny K, Zhang S. Bacterial Speck of Tomato. 2017;2.
175. Kharina AV, Zaika SA, Yumyna YM, Zelena PP, Kornienko NO, Kosenko YA, et al. Detection of *Proteus mirabilis* and *Enterobacter cloacae* in tomato and pepper fruits and isolation of their bacteriophages. *Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України*. 2015;(4):13.
176. Zaika S, Kharina A, Chaika D. LOOKING FOR KILLERS: BACTERIOPHAGES AGAINST PHYTOPATOGENIC BACTERIA. 2013;4.
177. Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. In: Clokie MRJ, Kropinski AM, editors. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2009 [cited 2021 May 26]. p. 69–76. (Methods in Molecular Biology™). Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_7)
178. Bonilla N, Rojas MI, Cruz GNF, Hung SH, Rohwer F, Barr JJ. Phage on tap—a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks. *PeerJ*. 2016 Jul 26;4:e2261.
179. Katagiri F, Thilmony R, He SY. The *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* Interaction. *Arab Book Am Soc Plant Biol*. 2002 Mar 27;1:e0039.
180. Kornienko N, Dukhno E, Kharina A, Budzanivska I. Isolation of bacteriophages with lytic activity against a newly identified *Pantoea*

- agglomerans. Bull Taras Shevchenko Natl Univ Kyiv - Biol. 2019 Nov 1;77(1):50–5.
181. Ishiga Y, Ishiga T, Uppalapati SR, Mysore KS. Arabidopsis seedling flood-inoculation technique: a rapid and reliable assay for studying plant-bacterial interactions. Plant Methods. 2011 Oct 6;7:32.
182. Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 1987 Dec 20;6(13):3901–7.
183. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods. 2012 Jul;9(7):676–82.
184. Gill:CsCl step gradient for phage K - OpenWetWare [Internet]. [cited 2021 Sep 9]. Available from: [https://openwetware.org/wiki/Gill:CsCl\\_step\\_gradient\\_for\\_phage\\_K](https://openwetware.org/wiki/Gill:CsCl_step_gradient_for_phage_K)
185. ИНСТРУКЦИЯ. «ДНК-сорб-С-М» - PDF Скачать Бесплатно [Internet]. [cited 2021 Sep 9]. Available from: <https://docplayer.com/63720103-Instrukciya-dnk-sorb-s-m.html>
186. Head SR, Komori HK, LaMere SA, Whisenant T, Van Nieuwerburgh F, Salomon DR, et al. Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. BioTechniques. 2014 Feb 1;56(2):61–77.
187. Tukey JW. Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. Biometrics. 1949;5(2):99–114.
188. van Belkum A. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Volume 2, Parts A–C, 2nd Edition). FEMS Immunol Med Microbiol. 2006 Apr 1;46.

- 189.Sillankorva S, Neubauer P, Azeredo J. Isolation and characterization of a T7-like lytic phage for *Pseudomonas fluorescens*. *BMC Biotechnol.* 2008 Oct 27;8(1):80.
- 190.Vidaver AK, Koski RK, Van Etten JL. Bacteriophage  $\phi$ 6: a Lipid-Containing Virus of *Pseudomonas phaseolicola*. *J Virol.* 1973 May 1;11(5):799–805.
- 191.Gullino ML, Gilardi G, Sanna M, Garibaldi A. Epidemiology of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on tomato. *Phytoparasitica.* 2009 Oct 1;37(5):461.
- 192.Meaden S, Paszkiewicz K, Koskella B. The cost of phage resistance in a plant pathogenic bacterium is context-dependent. *Evol Int J Org Evol.* 2015 May;69(5):1321–8.

## ДОДАТКИ

### Додаток 1. Список опублікованих праць здобувача

#### Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

- 1) Korniienko N., Dukhno E., Kharina A., Budzanivska I. Isolation of bacteriophages with lytic activity against a newly identified *Pantoea agglomerans*. Вісник Київського університету ім. Тараса Шевченка. Біологія. 2019. 77:50-54. DOI:10.17721/1728\_2748.2019.77.50-55 (Дисертантом проведено відбір зразків, експериментальна частина роботи, аналіз та обговорення результатів, написання статті).
- 2) E. O. Dukhno, N. O. Kornienko, S. R. Shybanov, I. G. Budzanivska, A. V. Kharina. Complete genome sequence of Serratia phage 4S isolated from wastewater in Ukraine. Biopolymers and cell. 2021. 37(4):315-322. DOI:10.7124/bs.000A5D (Дисертантом проведено відбір зразків, експериментальна частина роботи) (Scopus, Web of Science)
- 3) Korniienko N., Kharina A., Budzanivska I., Burketová L., Kalachova T. Phages of phytopathogenic bacteria: high potential but challenging application. Plant Protection Science. 2022. 58(2):81-91. DOI: 10.17221/147/2021-PPS (Дисертантом проведено аналіз літературних даних, написання статті) (Scopus, Web of Science)
- 4) Korniienko, N.; Kharina, A.; Zreløvs, N.; Jindřichová, B.; Moravec, T.; Budzanivska, I.; Burketová, L.; Kalachova, T. Isolation and Characterization of Two Lytic Phages Efficient Against Phytopathogenic Bacteria From Pseudomonas and Xanthomonas Genera. Frontiers in Microbiology. 2022. 13:853593. DOI:10.3389/fmicb.2022.853593 (Дисертантом проведено відбір зразків, експериментальна частина роботи, аналіз та обговорення результатів, написання статті). (Scopus, Web of Science)

### Опубліковані праці апробаційного характеру:

- 5) Korniienko N., Dukhno E., Kharina A., Budzanivska I. Isolation of phages specific to *Pantoea agglomerans* and detection of their activity on pepper plants. EMBO workshop «Viruses of microbes». Wrocław, Poland, 2018, 09-13 of July. 180 p.
- 6) Kornienko N., Dukhno E., Kharina A., Budzanivska I. Detection of *Serratia marcescens* bacteriophages in wastewaters. Czechoslovak Virology conference. Bratislava, Slovakia, 2019, 13-15 of February. 82 p.
- 7) Kornienko N., Kalachova T., Kharina A., Budzanivska I. Characterization of newly isolated phages specific to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. IX International Conference “Bioresources and viruses”. Kyiv, Ukraine, 2019; 9-11 of September. 35 p.
- 8) Korniienko N., Kharina A., Burketova L., Kalachova T. Characterization of newly isolated phages of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and their interactions with plant host *Arabidopsis thaliana*. 11th Scandinavian Plant Physiology Society PhD Student Conference. Turku, Finland, 2020, 2-4 of September. 46 p.
- 9) Korniienko N., Kharina A., Burketova L., Kalachova T. The impact of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and newly isolated specific phages co-infection on plant host *Arabidopsis thaliana*. FEMS Online Conference on Microbiology. Belgrad, Serbia, 2020, 28-31 of October. 440 p