ПРЕПАРАТ СМЕСИ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И БОРЬБЫ С БАКТЕРИАЛЬНЫМИ БОЛЕЗНЯМИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ.

Е.В. Камилова, С.Б. Монаков, Т.Габисония1, К.Северинов2
Институт генетики и экспериментальной биологии растений АН РУз, П/о Юкори-Юз, Ташкенская обл, Кибрайский р-он, Узбекистан
1 Институт бактериофагии, микробиологии и вирусологии им. Г.Элиава, АН Грузии, Тбилиси, Грузия
2 Waksman Institute Rutgers, The State University of New Jersey, Piscataway, New Jersey, USA

Резюме

- Профилактику и борьбу с бактериальными болезнями сельскохозяйственных растений осуществляют с помощью смеси бактериофагов, специфичных к штаммам указанных бактерий. Бактериофагами обрабатывают зараженные семена, больные растения или растительные материалы, почву, на которой выращиваются растения, добавляют в оросительную воду, а также, в почву, почвенные добавки. Описан набор бактериофагов и способ его использования.
- Основным преимуществом изобретения является создание препарата, лечение и профилактика бактериальных болезней растений, методами альтернативными химическим бактерицидным препаратам, загрязняющим окружающую среду. Использование химических бактерицидных препаратов помогает контролировать развитие этих патогенов, однако в ряде случаев эффективность от их применения весьма низка, часто эти препараты небезопасны для растений и окружающей среды. Лизирующие бактериофаги, бактериальные вирусы, которые избирательно убивают и лизируют фитопатогенные бактерии, служат альтернативным методом борьбы с болезнями растений. Впервые в мире, коллективом авторов был получен препарат бактериофага Концентрат бактериофага Поливалентный - рабочее название «ГУ, THE MAGICIAN», лизирующего бактерию *Xanthomonas malvacearum,* возбудителя гоммоза хлопчатника. Аналогично был получен препарат бактериофага против бактериального ожога риса.

Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

PREPARATION OF A MIXTURE OF BACTERIOPHAGES FOR PREVENTION AND FIGHT AGAINST BACTERIAL DISEASES OF AGRICULTURAL PLANTS

- Prevention and fight against bacterial diseases of agricultural plants are carried out using a mixture of bacteriophages specific to strains of the bacteria. Bacteriophages are used to treat the following objects: infected seeds, ill plants or plant materials, soil, etc. where the infected plants are growing, irrigating water, soil in other sites, soil supplements. The set of bacteriophages and the method of its application have been described.
- The main advantage of the invention is development of a preparation to treat and prevent bacterial plant diseases by the method which is an alternative to chemical bactericidal preparation contaminating environment. Application of chemical bactericidal preparations enables to control the pathogens, however, frequently the efficacy of their application is rather low and, in addition, these preparations are not safe both for plants and environment. Lysing bacteriophages are bacterial viruses which selectively damage and dissolve phytopathogenic bacteria and are an alternative method of fighting against diseases. A team of authors pioneered in developing bacteriophage preparation with a work-name "GU, THE MAGICIAN" which is a Polyvalent concentrate of Bacteriophage lysing bacteria *Xanthomonas malvacearum,* the causative agent of cotton gummosis. Using the same method they obtained a bacteriophage preparation against bacterial rice blight.

Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

Введение

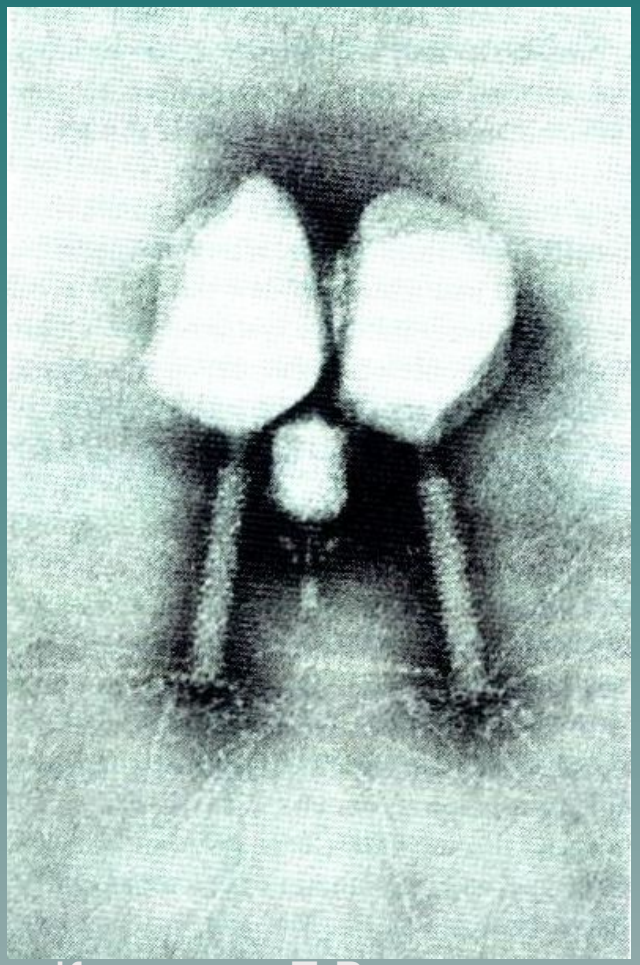
- Впервые использовать бактериофаги как потенциальные агенты, позволяющие контролировать бактериальные заболевания было предложено ещё в 1925 году (Moore, 1926, Okabe, 1963) [1, 2], и Thomas (1935) [3] успешно их использовал для контроля болезни Стюарта (увядание бактериальное), поражающей зерновые. Фаги использовались Civerolo et al. (1969) [4] и Civerolo et al. (1973) [5] для того, чтобы снизить поражение пятнистостью дырчатой бактериальной (Bacterial Spot, вызываемую *Xanthomonas pruni*) на сеянцах персика на 86% до 100%. Однако большинство из опубликованных исследований фагов, специфичных к бактериям-возбудителям болезней растений, не были ориентированы на лечение этих болезней; фаги часто использовали просто как средство для определения типа поражающих растения бактерий. Обзоры применения бактериофагов различных возбудителей болезней растений были опубликованы Goto (1963) и Gill and Abedon (2003) [6].

Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

- Бактерия *E.amylovora* является одним из наиболее часто изучаемых возбудителей, и в нескольких публикациях, появившихся в 60-годы прошлого века, описаны выделение, характеристика и указаны способы использования различных фагов определения типа штаммов *E.amylovora*. Первое сообщение о возможной роли бактериофагов в эпидемиологии бактериального ожога, вызванного *E.amylovora,* было сделано Erskine (1973) [6]. В дальнейшем специфичный к *E.amylovora* фаг, ØEal, успешно использовали для лечения/профилактики бактериального ожога саженцев яблони, инокулированных *E.amylovora* (Ritchie, Klos, 1979; 1977) [7,8]. Сообщалось также, что обработка деполимеразой полисахаридов, которую кодирует ØEal, ослабляет симптомы бактериального ожога у груш, инокулированных *E.amylovora* (Hartung et al., 1988) [9]. Schnabel et al. (2001) [11] недавно сообщили о выделении нескольких специфичных к *E.amylovora* бактериофагов (некоторые из них идентичны или тесно родственны ØEal) из образцов различных фруктов и почвы, взятых в местах с признаками бактериального ожога. Подобные исследования других болезней растений, вызываемых бактериями, были проведены рядом учёных в других целях – иногда даже необычных, но близких, -применениях. В контексте последнего замечания можно упомянуть о том, что колонизация *E.herbicola* и *Pseudomonas syringae,* по мнению некоторых авторов, способствует восприимчивости некоторых видов растений к повреждению тканей, вызываемых воздействием низких температур, действуя как образующие кристаллы льда ядра при 1-3оС. Kozloff et al. (1983) получил в США патент, основанный на идее, что фагов, нацеленных (убивающих) эти два вида можно было бы использовать для снижения их популяции на листьях растений и увеличить морозоустойчивость обработанных фагом растений. Результаты этих экспериментов позволяют предположить, что растения, заражённые *E.herbicola* и обработанные *E.herbicola* – специфичными фагами, имеют поражение ниже на 20%-25% по сравнению с растениями экспериментально заражёнными *E.herbicola,* но не обработанными фагами.

Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

Электронная микрофотография фагов Ø29 и Т2.



Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

- Jakson (1989) [11] получил патент США на использование препаратов фагов для (а) устранения естественного заражения *P.syringae* из бобов фасоли, собранных из поврежденных на корню растений, (б) снижения ряда симптомов болезни на листьях бобов в сильной степени инфицированных *P.syringae*. Этот же автор разработал препараты фагов, поражающих *Ralstonia solanacearum* и *Xanthomonas campestris pv.visicatoria*, бактериальных патогенов вызывающих два основных заболевания томатов, - бактериальное увядание и пятнистость бактериальную, соответственно. В полевых условиях, обычно смесью фагов поливали почву под посевами растений в возрасте 6-8 недель; в теплицах, фаги добавляли в оросительную воду (Fox, 2000). Через 2 недели после инокуляции патогеном, 60% растений не обработанных фагами потеряли листья более чем на 12% , в то время как дефолиация на всех обработанные фагами вариантах была менее, чем 12%. Наблюдаемые результаты наглядны и впечатляют. Результаты этих исследований многообещающие, они свидетельствуют, что бактериофаги могут служить ценным инструментом если иметь дело с различными болезнями растений, вызываемых бактериями.

Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

Материалы и методы

- В процессе научных исследований использовали общепринятые методы:
- - маршрутные обследования производственных посевов хлопчатника и риса со сбором образцов растений с признаками болезней (Чумаков, Захарова, 1990) [12].
- - микробиологическая экспертиза гербарных образцов растений и семян (Наумова, 1970) [13].
- - идентификация выделенных штаммов бактерий с применением тестов Standard Kit Complete for DAS ELISA (Schaad, and Frederick, 2002) [14];
- - наработка бактериального инокулюма и инокуляция растений (Manual of methods for general bacteriology, Philipp Gerhard (ed. in chair), 1981) [15];
- -выделение вирулентного бактериофага из объектов окружающей среды (Elizabeth Kutter, Alexander Sulakvelidze , 2005) [16,17];
- - лабораторные, вегетационные и полевые эксперименты по оценке эффективности фаготерапии бактериальных болезней (Williams, P.H., 1985; Alvarez, A.M. et al, 1994) [18,19];.
- - статистическая обработка экспериментальных данных ANOVA компьютерное программное обеспечение PASS/NCSS/GESS.

Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

Рис.1. Результаты теста DAS-ELISA (№ 1-93 суспензия бактерий, выделенных из семян риса сотрудниками ИГиЭБР АН РУз, № 94- положительный контроль *Xanthomonas orysae pv.orysae*, Cat. No 07130PC, № 95- отрицательный контроль, образец здорового растения, Cat. No 07130NC, № 96 – суспензия бактерии *Xanthomonas campestris pv. oryzae* XO604).

Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

Результаты и обсуждение

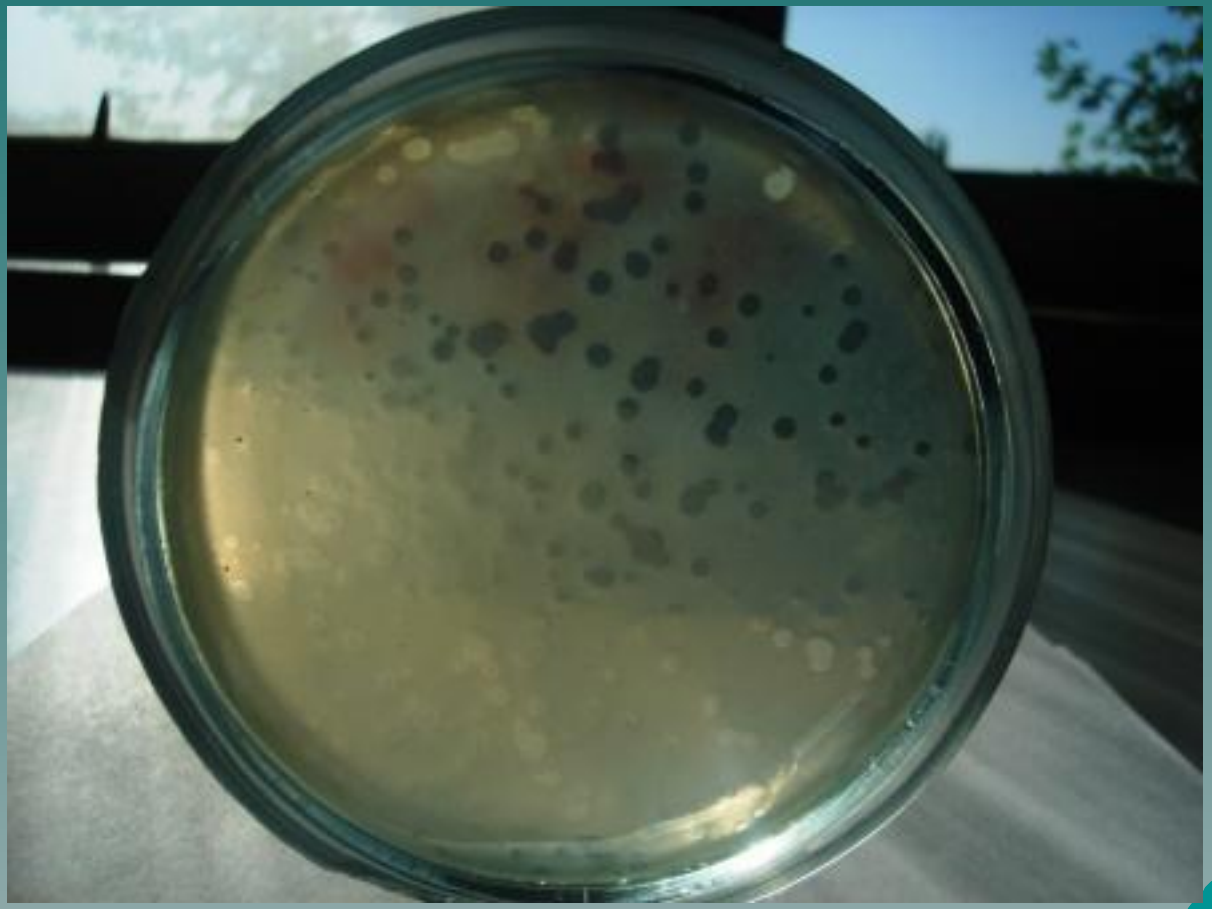
- В течение 2007 г. в Институте бактериофагии, микробиологии и вирусологии им. Г. Элиава, АН Грузии были выделены 16 новых фагов против штаммов *Xanthomonas campestris pv. malvacearum* и *Xanthomonas campestrispv. oryzae*: а) были выделены 4 новых фага против штаммов *Xanthomonas campestris pv. malvacearum*. Фаги были выделены из сточной воды реки Куры (9 проб). Были приготовлены концентраты 3 фаговых клонов условно названых ГУ 8, ГУ 9, ГУ 10.; б) были выделены 6 новых фагов против штаммов *Xanthomonas campestris pv. malvacearum*. Фаги были выделены из сточной воды реки Куры и Риони (8 проб). Были приготовлены концентраты 6 фаговых клонов условно названых ГУ 20, ГУ 21, ГУ 22, ГУ 23, ГУ 24, ГУ 25; в) были выделены 4 новых фага против штаммов *Xanthomonas campestris*. Фаги были выделены из сточной воды реки Куры, Алазани и Риони (6 проб). Были приготовлены концентраты 4 фаговых клонов условно названых ГУ 30, ГУ 31, ГУ 32, ГУ 33; г) были выделенны 3 новых фагов против штаммов *Xanthomonas campestris pv. malvacearum.* Фаги были выделенны из сточной воды реки Куры, Храми и Риони (5 проб). Были приготовлены концентраты 4 фаговых клонов условно названых ГУ 100, ГУ 101, ГУ 102. В 2007 году был создан фаговый препарат против *Xanthomonas campestris pv. oryzae*.

Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

Xanthomonas campestris pv. malvacearum- выделен из семядольных листьев больных растений хлопчатника, отобранных в Бухарском районе Бухарской обл., сорт Бухара-6.

Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

Негативные колонии (зоны лизиса), на двухслойном агаре с бактерией-хозяином *Xanthomonas campestris pv. malvacearum*, вызванные бактериофагом «ГУ, THE MAGICIAN».



Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

Препарат бактериофага, выделенный из сточной воды, активный против возбудителя гоммоза хлопчатника

Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

- Таким образом был получен препарат бактериофага, способный лизировать возбудителя гоммоза хлопчатника *Xanthomonas campestris pv. malvacearum*. Бактериофаг (рабочее название «ГУ, THE MAGICIAN»), является узко специфичным к возбудителю гоммоза хлопчатника. Он не лизирует другие бактерии, имеющиеся в организме человека и окружающей среде; не оказывает эффекта на человека, который относится к эукариотам, поскольку поражает исключительно бактерии. Бактериофаг не является трансгенным, выделен по известным методикам [16,17] из объектов окружающей среды, содержащих *Xanthomonas malvacearum* (почва, гербарий больных растений, семена хлопчатника, зараженные гоммозом и т.д.).
- Аналогично был получен препарат бактериофага против бактериального ожога риса.

Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

2. Оценка эффективности фаговой терапии пораженных растений значимых для сельского хозяйства Узбекистана

- В 2006-2007 гг. были проведены вегетационные и тепличные опыты для оценки эффективности лечения фаговыми препаратами хлопчатника. Заражение семян хлопчатника проводили нанесением суспензии бактерий на опушенные семена хлопчатника. Семена сбрызгивали смывом культуры с агаровой пластинки (пробирки). Заражение растений проводили опрыскиванием в фазе 2-3 настоящих листа суспензией бактерии-фитопатогена с концентрацией 106 клеток/мл.
- В опытах были использованы два сорта хлопчатника *G.hirsutum* - Илгор и АН Баяут-2. Семена предварительно были проверены на отсутствие *Xanthomonas campestris pv. malvacearum* (Smith 1901) Dye 1978. Кроме того, в опыте с хлопчатником были использованы семена сорта Илгор, взятые из пораженных гоммозом хлопковых коробочек (внутренняя инфекция). Для опыта использовали сосуды Вагнера, вмещающие по 20 кг почвы.

Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

Варианты опыта на хлопчатнике:

- контроль 1 – незараженные семена;
- - контроль 2 – семена, предварительно зараженные бактерией *Xanthomonas campestris pv. malvacearum*;
- - предпосевная обработка зараженных семян химическим бактерицидным препаратом («Бронотак», Германия, производство Bayer Crop Science, расх.6,0-7,0 кг/т);
- - предпосевная обработка зараженных семян смесью фагов ГУ2 и ГУ3 за 2 дня до посева проводили нанесением 2 мл препарата на 10 г семян (доза обработки 60 л на 1 тонну семян препаратом с титром 108 pfu/ml);
- - трехкратное опрыскивание в фазу 1-2 н/листа смесью фагов ГУ2 и ГУ3 с титром 107 pfu/ml (с интервалом в 3-5 дней) растений, выросших из предварительно зараженных семян;
- - трехкратный полив в фазу 1-2 н/листа смесью фагов ГУ2 и ГУ3 с титром 107 pfu/ml (с интервалом в 3-5дней) растений, выросших из предварительно зараженных семян. Кроме того, параллельно был поставлен аналогичный опыт в пластмассовых горшочках емкостью 1,5 кг почвы, в которые высевали по 15 семян с последующим оставлением 10 растений в каждом сосуде.

Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

- Как свидетельствуют данные таблицы 1, независимо от сорта хлопчатника и способов применения, баковая смесь бактериофагов ГУ2 и ГУ3 в определенной степени способствует снижению пораженности хлопчатника гоммозом и потерь урожая хлопка-сырца при развитии гомоза в посевах хлопчатника на 15-30%.

Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

Растения хлопчатника (внизу – обработка препаратом бактериофага).

Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

Таблица 1- Эффективность фаготерапии в борьбе с гоммозом хлопчатника в зависимости от сорта и методов применения бактериофага в вегетационном опыте

Вариант опыта	Вид обработки	Растений с признаками гомоза (%) по повторностям					Биол. эф-ть, %	Сред. кадр. отклон ± σ	Дис-пер-сия
		I	II	III	IV	средн			
Средневолокнистый хлопчатник сорта АН Баяут-2									
Контроль - 1	Без обработки	0	0	0	0	0,0	-	0.0	0.00
Контроль - 2	Предпосевное заражение семян возбудителем гоммоза	40	20	30	40	32,5	-	275.0	91.67
Бронотак	Предпосевная обработка семян, зараженных возбуди-телем гоммоза	10	0	0	0	2,5	92,3	75.0	25.00
Смесь фагов ГУ2 + ГУ3	Предпосевная обработка семян, зараженных возбуди-телем гоммоза	10	10	0	10	7,5	76,9	75.0	25.00
	Опрыскивание*в фазу 1-2 н/листа растений, выросших из зараженных семян	10	20	10	10	12,5	61,5	75.0	25.00
	Полив* в фазу 1-2 н/листа растений, выросших из зараженных семян	20	20	10	10	15,0	52,3	100.0	33.33
Средневолокнистый хлопчатник сорта Илгор									
Контроль - 1	Без обработки	0	0	0	0	0,0	-	0	0.0
Контроль - 2	Предпосевное заражение семян возбудителем гоммоза	30	50	40	40	40,0	-	200	66.7
Смесь фагов ГУ2 + ГУ3	Предпосевная обработка семян, зараженных возбудителем гоммоза	0	10	0	10	5,0	87,5	100	33.3
	Предпосевная обработка семян, зараженных возбудителем гоммоза	10	20	10	0	10	75,0	200	66.7

Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

- Экспериментальные данные обработаны статистическим методом ANOVA (компьютерное программное обеспечение PASS/NCSS/GESS). Полный F-тест средних значений урожайности хлопчатника (г/растение) подтвердил эффективность обработки фаговыми препаратами. Полученные данные свидетельствуют о снижении пораженности гоммозом на 50-90% и при обработке препаратом ГУ2+ГУ3. Тест попарного индивидуального сравнения вариантов, с соответствующим коэффициентом Bonferroni, показал, что имеются существенные различия между всеми вариантами обработки, кроме зараженного контроля и 0.85% NaCl. Для того, чтобы протестировать имеющиеся у нас фаги Хр10 и Хр12, убивающие *Xanthomonas campestris pv. oryzae* в 2006-2007 гг. в вегетационных сосудах был заложен опыт с зараженными растениями риса (трехкратная повторность, 30 растений риса на 1 сосуд). В вегетационном опыте были использованы два сорта риса - УзРос 713 и Аланга. Отмечается снижение пораженности растений риса на 85-90% при всех вариантах обработки растений фаговыми препаратами.

Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

Выводы

- Создан препарат, подавляющего возбудителей болезней, вызываемых фитопатогенными бактериями (гоммоз хлопчатника, ожог риса и др.) на основе композита бактериофагов, избирательно убивающего фитопатогенные бактерии.
- Набор бактериофагов выделен по известным методикам (F. B. Iriarte et al., 2007, Alexander Sulakvelidze, 2005) из объектов окружающей среды, содержащих фитопатогенные бактерии (почва, ирригационная и сточная вода, гербарий больных растений, семена пораженных растений, и т.д.).
- Композит бактериофагов содержит ряд мутантов фагов, которые поражают возникающие устойчивые к ним мутанты бактерии *Xanthomonas.* Концентрат бактериофага обладает способностью специфически лизировать бактерии *Xanthomonas* возбудителя бактериальных болезней растений. Препарат представляет собой стерильный фильтрат фаголизата бактерии *Xanthomonas*.
- Композит мутантов вирусов наносится на источник распространения бактерий, например, семена, путем инфильтрации, либо поверхностного замачивания. Также, композит бактериофагов можно вносить прямо в почву или ирригационную воду. На вегетирующих посевах растений, композитом можно опрыскивать растения, или наносить тампоном на пораженные участки.
- Концентрат бактериофага Поливалентный снижает пораженность растений бактериальными болезнями, на 50-90% и способствует повышению урожайности растений.

Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca

Проявление гоммоза на семядольных листьях хлопчатника сорта Илгор при искусственном заражении (полевой опыт, Зангиатинский р-он Ташкентской области, 2007 г.).

Камилова Е.В.
elenakamilova@yahoo.ca