

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ *XANTHOMONAS CAMPESTRIS*
PV. *CAMPESTRIS* И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ЗАЩИТЫ КАПУСТЫ
ОТ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА

А.Т. ОРЫНБАЕВ¹, А.П. КАБАНОВА², Е.А. ОБРАЗЦОВА²,
А.Н. ИГНАТОВ^{3,4}, К.А. МИРОШНИКОВ², Ф.С. ДЖАЛИЛОВ¹

¹РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева,

²ИБХ имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

³ООО «Исследовательский центр «ФитоИнженерия»,

⁴Российский университет дружбы народов)

Из образцов почвы под зараженными сосудистым бактериозом растениями капусты, был выделен 21 изолят бактериофагов, специфичных для 11 штаммов-мишеней *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Электронно-микроскопическое исследование морфологии бактериофагов позволило отнести 3 изолята к семейству Siphoviridae, а остальные 18 образцов – к семейству Myoviridae. В результате анализа данных фаготипирования 73 штаммов фитопатогена по отношению к вновь выделенным изолятам и 4 коллекционным штаммам бактериофагов предложено создать фаговый коктейль из изолятов BT2, SM10, Ph30–1, Ph44, DB1 и Tir2, которые в совокупности способны инфицировать 88% штаммов коллекции *X. campestris* pv. *campestris*, представительной для российской популяции патогена. Обработка семян капусты сорта Московская поздняя 15 с высокой естественной зараженностью патогеном (25,6%) коктейлем бактериофагов привела к значительному снижению зараженности проростков сосудистым бактериозом. Биологическая эффективность применения коктейля бактериофагов составила 90,6%.

Ключевые слова: сосудистый бактериоз, бактериофаги, фаговый коктейль, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Введение

Сосудистый бактериоз, вызываемый бактерией *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Хсс), считается одним из наиболее опасных заболеваний Капустных культур [8].

Основным источником инфекции являются зараженные семена. В связи с тем, что даже слабая инфицированность (от 0,03%) способна вызвать быстрое перезаражение рассады в теплице – при единственном зараженном растении на кассете, через три недели зараженными оказываются 60% растений, такое быстрое распространение патогена приводит к серьезным потерям от болезни в поле (от 10 до 50%) [9], что обуславливает высокие требования, предъявляемые к эффективности предпосевной обработки семян.

Ранее было установлено, что при обработке искусственно заражённых Хсс семян капусты путем замачивания в 2%-ном р-ре препарата Гамаир КС (на основе *Bacillus subtilis*), биологическая эффективность составляла 68,2–89,5%, а при использовании

препарата Фитолавина, ВРК (на основе антибиотика фитобактериомицина) – достигала 83,2–91,6% [3]. Высокую эффективность показало также использование для обработки заражённых семян надуксусной кислоты и некоторых эфирных масел [5, 2]. Тем не менее, поиск эффективных биологических средств обеззараживания семян и защиты рассады продолжает быть актуальной задачей.

Значительное внимание в защите от бактериальных болезней растений в последние годы уделяется использованию вирусов, способных к размножению в бактериальных клетках – бактериофагов. Биологическая защита с помощью бактериофагов, специфических к конкретным фитопатогенам, имеет много достоинств – производство и применение их сравнительно просто, недорого и безопасно для человека, животных и растений [1, 4]. Для успешного практического применения бактериофагов требуется предварительная селекция литических изолятов бактериофагов с широким штаммовым спектром действия, создание высокоэффективных и стабильных коктейлей фаговых препаратов, тестирование их на патогенных бактериях в модельных и природных системах [4, 12].

Предварительные опыты на нескольких изолятах бактериофагов показали в модельных экспериментах перспективность их использования для обработки семян капусты. Так, при обработке искусственно зараженных семян бактериофагами зараженность рассады капусты снизилась в 2,0–4,1 раза по сравнению с контролем [12, 6].

Целью нашей работы являлось выделение коллекции литических бактериофагов, электронно-микроскопическая характеристика их морфологии, оценка их специфичности в применении к штаммам *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* и создание фагового коктейля с целью практического использования в защите капусты.

Материалы и методы

Исследование проводили в 2016–2018 гг. в лаборатории защиты растений РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева и в ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Выделение бактериофагов. Осенью 2016 года на полях ООО «Дмитровские овощи», Дмитровский район, Московская область, где наблюдалось сильное развитие сосудистого бактериоза на капусте, были отобраны образцы почвы для выделения бактериофагов.

Выделение бактериофагов проводили традиционным методом [1, 11]. Полученные изоляты бактериофагов хранили при +4°C и затем проверяли их способность к лизированию бактериальных культур *Xcc*.

Препаративное культивирование и очистка бактериофагов. Штаммы-хозяйева бактериофагов (табл. 1) наращивали в среде YDC при 28°C при интенсивном перемешивании до середины логарифмической фазы (оптическая плотность при 600 нм от 0,5 до 0,6). Выросшую культуру инокулировали единичной бляшкой фага и инкубировали до проявления признаков лизиса. Затем добавляли 0.5% об. хлороформа, энергично встряхивали и через 1 ч лизаты центрифугировали при 10000 g («Jouan») в течение 15 мин для удаления бактериальных фрагментов. Бактериофаги осаждали центрифугированием (22000 g, 90 мин, 15°C, ротор Beckman SW45). Надосадочную жидкость сливали, а для растворения осадка добавляли 2 мл SM-буфера (50 mM Tris pH 7,5, 0,1 M NaCl, 10 mM MgSO₄, 0,01% желатин) и оставляли на 2–5 часов. Ресуспендированные препараты бактериофагов очищали ультрацентрифугированием (66000 g, 120 мин, 15°C, ротор Beckman SW28) в ступенчатом градиенте плотности CsCl 0.5–1.7 г/мл. Суспензии фагов диализовали против фагового буфера (10 mM Tris HCl, pH 7.4, 10 mM MgSO₄). Препараты очищенных фагов хранили при 4°C.

Штаммы *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, использованные в работе

№	Название штамма	Дата выделения	Место происхождения, культура
1–4	БК-55, БК-56, БК-57, БК-58	10.2017	Краснодарский край, белокочанная капуста
5–8	ЦК-71, ЦК-72, ЦК-73, ЦК-74	10.2017	Краснодарский край, цветная капуста
9–14	Хсс 1/2, Хсс 1/5, Хсс 2/12, Хсс 2/16, Хсс 3/23, Хсс 3/27	09.2017	Московская область, Дмитровский район, белокочанная капуста
15–26	Bes-1, SM-1, Bul, Bes-2, SM-2, Dmo 1–1, Dmo 2–2, Dmo 1–2, Dmo 1–3, Dmo 2–1, Dmo 2–3, Dmo 3	09.2016	Московская область, Дмитровский район, белокочанная капуста
27	Kas	09.2016	Московская область, Дмитровский район, цветная капуста
28–30	Tir1, Tir2, Tir3	11.2012	Молдова, город Тирасполь, капуста
31–35	DK-1, DK-2, DK-3, DB-1, DB-3	10.2012	Московская область, Серпуховский район, капуста
36–47	Ram 1–1, Ram 1–2, Ram 1–3, Ram 2–1, Ram 2–2, Ram 2–3, Ram 3–1, Ram 3–2, Ram 3–3, Ram 4–1, Ram 4–2, Ram 4–3	10.2012	Московская область, Раменский район, капуста
48–51	XУ-1–1, XУ 1–2, XУ 2–1, XУ 2–2	10.2012	Украина, город Херсон, капуста
52–54	B-1, B-2, B-3	09.2012	Московская область, ОПХ Быково, капуста
55–59	Tlo-1, Tlo-2, Tlo-3, Tlo-4, Tlo-5	08.2007	Тульская область, капуста
60	Bel-3	10.2006	Белоруссия, капуста
61	Bun-2	09.2006	Московская область, Дмитровский район, капуста
62	Dasch-2	09.2006	Московская область, Серпуховский район, капуста
63	04–29-B1	2004	США, Калифорния, капуста
64	Xn-13	1997	Япония, капуста
65	ex 528=NCPB528T	1957	Великобритания, капуста
66	Tr4	-	Молдова, город Тирасполь, капуста
67	33437		США, Wisconsin, редис
68–70	276NZ, 277NZ, 306NZ	-	Голландия
71–73	B100, SM35, SM17	-	-

Электронная микроскопия. Суспензию очищенных бактериофагов наносили на сетки и контрастировали 1% водным раствором уранилацетата [7]. Изображения получали с помощью электронного микроскопа «Zeiss Libra 120» с ускоряющим напряжением 120 кВ.

Фаготипирование (выбор изолятов для создания фагового препарата). В работе использовали чистые культуры штаммов возбудителя сосудистого бактериоза различного географического происхождения из коллекции лаборатории защиты растений РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, выделенные из капустных культур в разные годы (табл. 1).

Все тестируемые штаммы были патогенными на капусте. Перед тестированием бактерий выращивали на среде YDC в течение 48 часов при 28°C.

Тестирование патогенности изолятов бактериофагов по отношению к штаммам *Xcc* проводили капельным методом (рис. 1). Для сравнения использовали 4 изолята бактериофагов (DB1, Tir 2, R3-1, B1), выделенные в 2014 году [12].

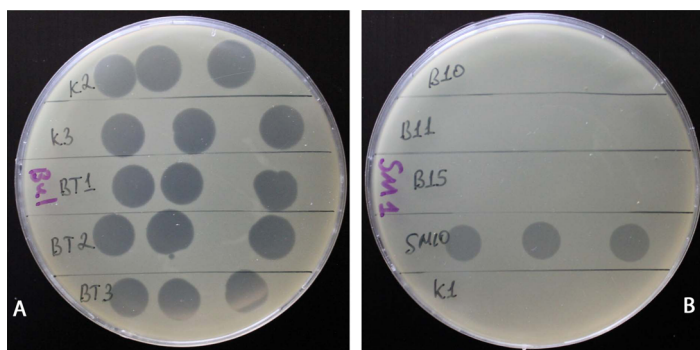


Рис. 1. Тестирование патогенности изолятов бактериофагов по отношению к штаммам *Xcc* Bul (A) и Sml (B) капельным методом

Биологическая эффективность фагового препарата. Для оценки биологической эффективности экспериментального фагового препарата проводили предпосевную обработку семян капусты сорта Московская поздняя 15 (*Brassica oleracea*) с естественной зараженностью сосудистым бактериозом (25,6%). Рабочая концентрация суспензии бактериофагов составляла 10^7 БОЕ/мл по каждому изоляту. В качестве эталона использовали Гамаир, КС (*Bacillus subtilis* М-22, 2×10^{10} кл/мл). Контролем служили зараженные семена без обработки.

Для определения зараженности семена проращивали на влажной фильтровальной бумаге в чашке Петри. В каждом варианте анализировали 3 повторности по 50 семян в каждой. Чашки выдерживали на свету при температуре 23–25°C. Через 7 дней после посева количество зараженных сосудистым бактериозом проростков учитывали путем визуального осмотра семядольных листочков. В сомнительных случаях пользовались бинокулярной лупой.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили методом дисперсионного анализа со сравнением средних по критерию Дункана с помощью пакета STATISTICA 12.0 и с использованием программы Microsoft Excel 2010. Данные выраженные в процентах предварительно преобразовывали в арксинусы.

Результаты и обсуждение

Из образцов почвы с использованием 11 штаммов-мишеней *Xcc* был выделен 21 изолят бактериофагов, список которых представлен в таблице 2. Результаты электронномикроскопического исследования морфологии фагов также представлены в таблице 2.

Морфологические характеристики и систематическое положение изолятов бактериофагов

Кластер	Изоляты бактериофагов	Штаммы хозяина (Хсс)	Размер, нм			Семейство
			длина хвоста	ширина хвоста	диаметр головки	
3	BT 1	Bul	127,6±4,7	0,35±0,01	53,1±1,1	Myoviridae
4	BT 2		130,7±2,8	0,36±0,01	58,5±0,9	Myoviridae
3	BT 3		131,0±2,2	0,35±0,01	55,4±1,4	Myoviridae
1	B10	Bes 1	127,8±0,7	0,37±0,01	56,4±0,9	Myoviridae
3	B11		133,9±2,0	0,33±0,02	57,5±0,5	Myoviridae
3	B15		127,8±2,5	0,35±0,01	57,5±0,8	Myoviridae
2	K 1	Kas	132,8±1,1	0,36±0,01	55,2±0,5	Myoviridae
3	K 2		128,9±2,5	0,33±0,01	55,4±1,5	Myoviridae
3	K 3		124,9±3,2	0,34±0,01	54,6±0,9	Myoviridae
4	SM 10	SM 1	157,6±4,8	0,15±0,01	53,1±2,8	Siphoviridae
4	Ph 30–1		167,3±4,0	0,18±0,01	53,7±1,4	Siphoviridae
5	BT2*SM1		160,6±4,3	0,16±0,01	52,8±0,4	Siphoviridae
1	BS25	Bes 2	129,1±2,1	0,36±0,01	55,9±0,5	Myoviridae
2	BS30		131,8±1,4	0,33±0,01	53,8±1,1	Myoviridae
2	D10	Dmo 1–1	133,6±0,9	0,34±0,01	60,6±1,6	Myoviridae
1	D20	Dmo 2–2	129,3±2,5	0,38±0,03	57,9±1,0	Myoviridae
5	Ph 11	Dmo 1–2	137,8±1,6	0,34±0,01	53,2±1,0	Myoviridae
5	Ph 20	Dmo 1–3	136,2±2,0	0,35±0,02	54,1±1,1	Myoviridae
3	Ph 30	Dmo 2–1	133,9±1,2	0,36±0,01	53,3±1,1	Myoviridae
2	Ph 40	Dmo 3	132,0±1,2	0,36±0,01	55,1±1,2	Myoviridae
3	Ph 44		130,8±4,8	0,30±0,01	53,7±1,3	Myoviridae

Установлено, что из 21 изолятов бактериофагов 3 изолята принадлежали к семейству *Siphoviridae* (рис. 2А, С), остальные 18 образцов принадлежали к семейству *Myoviridae* (рис 2В, D).

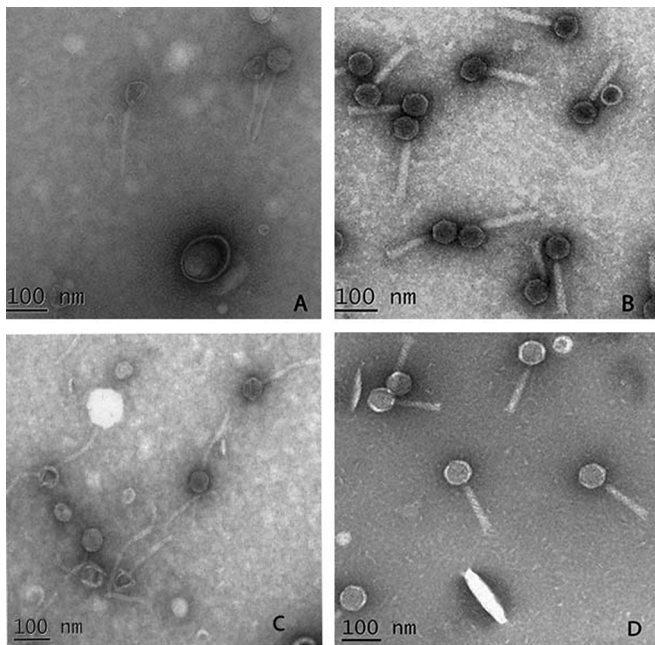


Рис. 2. Электронномикроскопическая морфология изолятов бактериофагов:
 А – *Siphoviridae*, SM 10; В – *Myoviridae*, K 2; С – *Siphoviridae*, Ph 30–1; D – *Myoviridae*, BS25

Необходимо учитывать, что бактериофаги обладают не только видоспецифичностью, но и специфичностью к отдельным штаммам хозяина, поэтому изоляты фагов, отобранные для практических целей, должны обеспечивать защиту от широкого круга штаммов патогенов растений. Это достигается созданием консорциума или коктейля фагов, в совокупности обеспечивающих защиту от большинства штаммов фитопатогена, распространенных в конкретных условиях. Для поиска кандидатов для создания фагового коктейля нами было проведено фаготипирование обширной коллекции штаммов возбудителя сосудистого бактериоза капусты.

Результаты испытания специфичности 25 изолятов бактериофагов к 73 штаммам фитопатогена представлены в таблице 3. Всего были выделены 22 типа реакции, каждый тип был представлен набором, содержащим от 1 до 29 штаммов патогена. Специфичность бактериофагов к штаммам хозяина варьировала в широких пределах (от 5,5% до 76,7% от общего числа тестированных штаммов Хсс), или от 18 до 73% типов реакции (таблица 3).

Для сравнения реакции изолятов бактериофага и штаммов патогенов использовали процентное различие (percent disagreement) и метод попарного внутригруппового невзвешенного среднего (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA) [11]. Первичные данные были проанализированы кластерным анализом при помощи программы STATISTICA 12.0 (StatSoft, USA) [10]. Результаты кластерного анализа представлены на рисунке 3 и 4. Изоляты бактериофагов были сгруппированы в 5 кластеров. Кластер 1 включал 4 изолята (B10, D20, BS25, DB1*), Кластер 2–7 изолятов (K1, BS30, D10, Ph40, Tir2*, B1*, R3–1*), в который вошли также 3 типовых изолята, выделенные в 2014 году (отмечены*). В Кластер 3 (n = 8) вошли изоляты B11, B15, K2, K3, BT1, BT3, Ph30, Ph44, в Кластер 4 (n = 3) – BT2, SM10, Ph30–1, в Кластер 5 (n = 3) – изоляты Ph11, Ph20, BT2*SM1. Различия между Кластерами 1+2+3 и 4+5 были наиболее значимыми, в первую группу вошли 17 изолятов со средней специфичностью 66,6%, а во вторую – 6 штаммов со средней специфичностью 42,5%.

Таблица 3
Специфичность изолятов бактериофагов по отношению к коллекции штаммов *X. campestris* pv. *campestris*

Кластер штаммов	Тип реакции	Число штаммов в группе	Изоляты бактериофагов																				Частота положительной реакции											
			B 10	B 11	B 15	K 1	K 2	K 3	BT 1	BT 2	BT 3	SM 10	BS 25	BS 30	D 10	D 20	Pn 11	Pn 20	Pn 30	Pn 30-1	Pn 40	Pn 44		BT2 × SM1	DB 1*	Tir 2*	R 3-1*	B 1*						
1	1	29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,92
4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,16
5	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,28
1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0,84
1	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0,76
1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0,84
4	7	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	8	7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,84
1	9	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0,96
1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0,76
1	11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,84
2	12	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0,76

Классификация штаммов	Тип реакции	Число штаммов в группе	Изоляты бактериофагов																Частота положительной реакции										
			B 10	B 11	B 15	K 1	K 2	K 3	BT 1	BT 2	BT 3	SM 10	BS 25	BS 30	D 10	D 20	Ph 11	Ph 20		Ph 30	Ph 30-1	Ph 40	Ph 44	BT2 × SM1	DB 1*	Ttr 2*	R 3-1*	B 1*	
1	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0,76
1	14	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0,84
1	15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0,88
4	16	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,04
3	17	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,48
1	18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0,84
4	19	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0,12
4	20	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0,12
4	21	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0,12
1	22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0,84
Частота положительной реакции	-	-	0,59	0,68	0,68	0,64	0,68	0,68	0,68	0,68	0,64	0,59	0,59	0,64	0,64	0,64	0,32	0,27	0,73	0,55	0,59	0,73	0,18	0,36	0,68	0,64	0,68	0,68	-

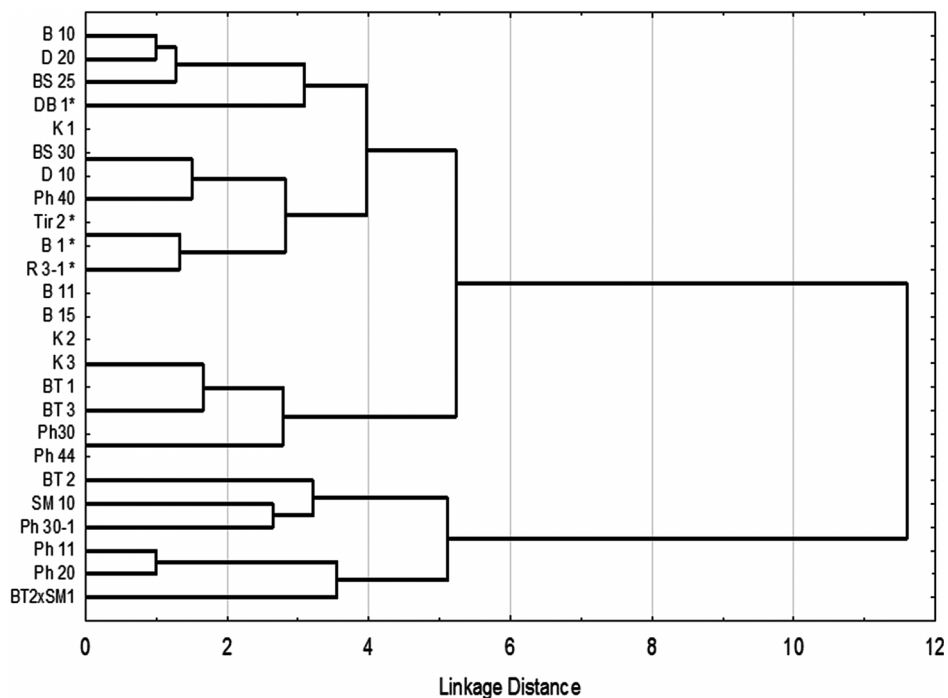


Рис. 3. Дендрограмма по результатам кластерного анализа реакции 25 бактериофагов с 73 штаммами *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Оценка различий между бактериофагами по простому сходству реакции (процентное расхождение), метод кластеризации – UPGMA [11]. Анализ проводили при помощи программы STATISTICA 12.0 [10]

Все три выделенные изолята семейства *Siphoviridae* вошли в 4 и 5 Кластеры и имели среднюю специфичность 25,7% (табл. 2). Все они были выделены с использованием нетипичного штамма SM1 (выделен в 2016 г. в Московской области, в Дмитровском районе из белокочанной капусты). Генотипирование штамма SM1 методом мультилокусного секвенирования (MLST) показало, что он относился к группе *Xcc*, доминировавшей в РФ до 2012 г. (данные не показаны). Кластерный анализ реакции штаммов *Xcc* показал, что имеющиеся 22 типа реакций бактерий были также группированы в 5 Кластеров. Первый кластер включал 13 типов реакции с 49 штаммами (67% от общего числа штаммов, поражились 84% изолятов бактериофагов), Кластер 4–6 типов реакции с 21 штаммом (28% штаммов, поражились 9,3% изолятов бактериофагов), а Кластеры 2, 3 и 5 включали по одному типу реакции с единственными представительными штаммами. Штаммы Кластеров 2, 3 и 5 поражились от 28 до 76% изолятов фагов.

Исходя из этих данных, нами предложено создать фаговый коктейль из изолятов BT 2, SM 10, Ph 30–1, Ph 44, DB1, Tir 2, которые в совокупности способны инфицировать 88% штаммов представительной коллекции *Xcc*. Выбранные изоляты были специфичны для всех типов взаимодействия со штаммами, кроме группы 7 (DB-1, DB-3, XU 1–2, XU 2–2, 04–29-B1, ex528, 277NZ, SM17, SM35), к которой не было найдено ни одного вирулентного фага.

Нами проведено тестирование эффективности защитного действия предложенного коктейля фагов по отношению к естественной семенной инфекции капусты. Предварительно при фитоэкспертизе нескольких партий семян капусты белокочанной была выделен образец семян сорта Московская поздняя 15 с высоким уровнем зараженности.

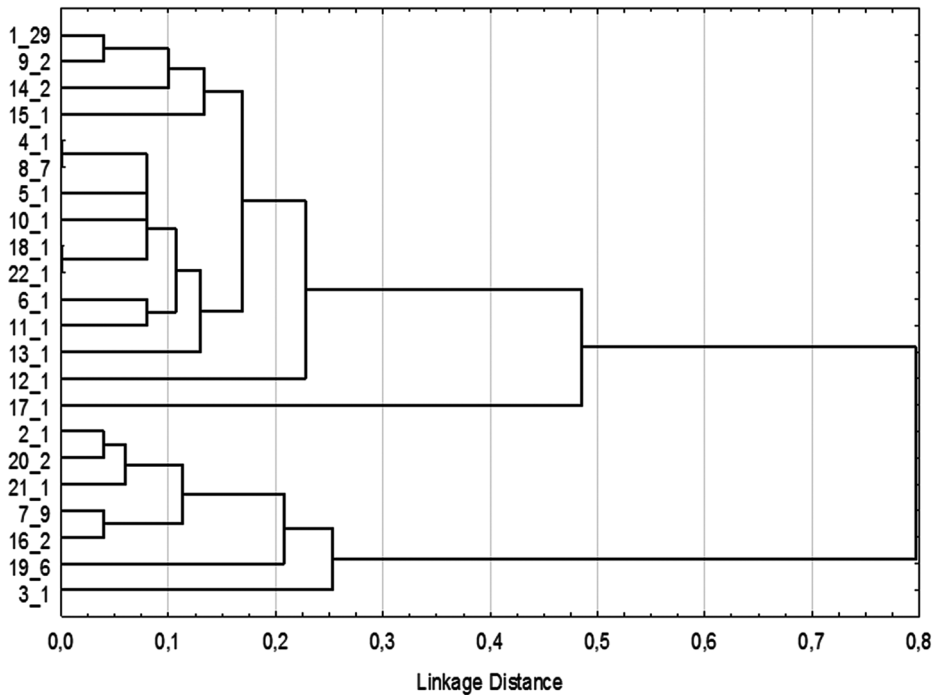


Рис. 4. Дендрограмма по результатам кластерного анализа реакции 73 штаммов *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* с 25 бактериофагами. Оценка различий между штаммами по простому сходству реакции (процентное расхождение), метод кластеризации – UPGMA [11]. Анализ проводили при помощи программы STATISTICA 12.0 [10]

Обработка семян коктейлем бактериофагов привела к снижению зараженности семян с 25,6% в контроле до 2,4% (рис. 5). Биологическая эффективность обработки бактериофагами составила 90,6% и была на уровне эталона (Гамаир, КС, 2%) – 89,3%.

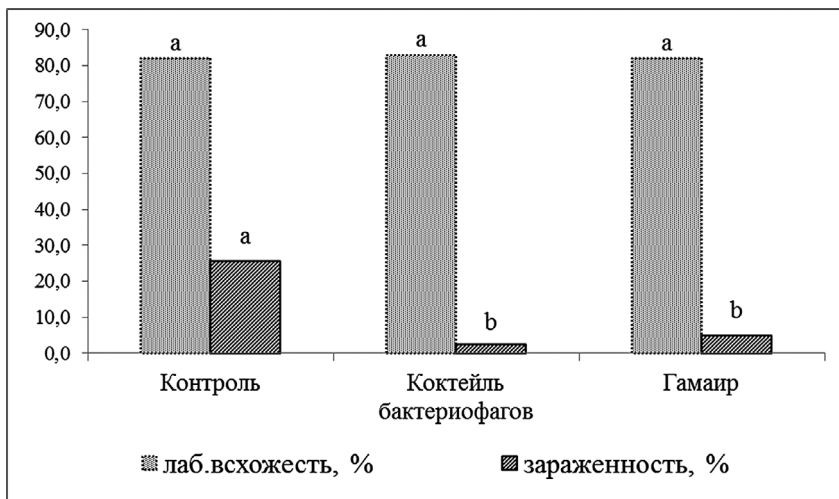


Рис. 5. Влияние фагового коктейля на лабораторную всхожесть семян и зараженность сосудистым бактериозом проростков капусты сорта Московская поздняя 15

Выводы (заключение)

1. Из образцов почвы с капустного поля с использованием 11 штаммов-мишеней *Xcc* был выделен 21 изолят бактериофагов.

2. Электронномикроскопическое исследование морфологии бактериофагов позволило отнести 3 изолята к семейству *Siphoviridae*, а остальные 18 образцов – к семейству *Myoviridae*.

3. По результатам фаготипирования 73 штаммов фитопатогена по отношению к 25 изолятам бактериофагов предложено создать фаговый коктейль из изолятов ВТ 2, SM 10, Ph 30–1, Ph 44, DB1, Tigr 2, которые в совокупности способны инфицировать 88% штаммов представительной коллекции *Xcc*.

4. Обработка семян капусты с высокой естественной зараженностью патогеном коктейлем бактериофагов привела к значительному снижению зараженности проростков сосудистым бактериозом, биологическая эффективность этого приема составила 90,6%.

Библиографический список

1. Бактериофаги: биология и практическое применение / Под ред. Э. Каттер, А. Сулаквелидзе // Пер. с англ. коллектив переводчиков; науч. ред. А.В. Летаров. – Москва: Научный мир, 2012. – 640 с.

2. *Во Тхи Нгок Ха, Джалилов Ф.С.* Антибактериальная активность эфирных масел и их использование для обеззараживания семян капусты от сосудистого бактериоза // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2014. Вып. 6. С. 59–68.

3. *Мазурин, Е.С.* Методы диагностики возбудителя сосудистого бактериоза капусты и меры защиты: диссертация... кандидата биологических наук: 06.01.11 / Мазурин Евгений Сергеевич; [Место защиты: Рос. гос. аграр. ун-т]. – Москва, 2009. – 107 с.

4. *Нифонтова В.В., Чугунова Е.О.* Получение бактериофагов и их применение в ветеринарии // Вестник Пермского научного центра. 2015. № 2. С. 54–59.

5. *Орынбаев А.Т., Джалилов Ф.С.* Обеззараживание семян капусты от сосудистого бактериоза // Картофель и овощи. 2018. № 1. С. 23–25.

6. *Орынбаев А.Т., Джалилов Ф.С.* Защита рассады капусты от сосудистого бактериоза / Международная научно-практическая конференция «Современные технологии и средства защиты растений – платформа для инновационного освоения в АПК России». Материалы конференции, 8–12 октября 2018 г., СПб – Пушкин. 2018. С. 115–116.

7. *Ackermann, H.-W.* Basic Phage Electron Microscopy // Bacteriophages: Methods and Protocols. 2009. V.1. P. 113–126.

8. *Bradbury J.F.* Guide to Plant Pathogenic Bacteria. 1986. Slough: CAB International.

9. *Dhar S., Singh D.* Performance of cauliflower genotypes for yield and resistance against black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) // Indian J Hort. – 2014. – Т. 71. – С. 197–201.

10. *Incorporation, S.* (2015). STATISTICA (data analysis software system) version 12.

11. *Sneath P.H.A., Sokal R.R.* Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. 1973.

12. *Во Thi Ngok Ha, Dzhaliyov F.S., Ignatov A.N.* Biological properties of bacteriophages specific to black rot pathogen of brassicas *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2015. Вып. 6. С. 28–36.

ISOLATION OF BACTERIOPHAGES SPECIFIC FOR *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CAMPESTRIS* AND BIOCONTROL OF BLACK ROT DISEASE OF CABBAGE

A.T. ORYNBAYEV¹, A.P. KABANOVA², YE.A. OBRAZTSOVA²,
A.N. IGNATOV^{3,4}, K.A. MIROSHNIKOV², F.S. DZHALILOV¹

(¹ Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy;

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences;

³ LLC “Research Center “PhytoEngineering”;

⁴ Russian University of People’s Friendship)

Twenty-one isolates of bacteriophages specific to eleven target strains of Xanthomonas campestris pv. campestris were isolated from soil samples collected under black rot-infected cabbage plants. An electron microscopic study of bacteriophage morphology allowed to classify 3 isolates as members of the Siphoviridae family, and the remaining eighteen isolates as those representing the Myoviridae family. After the analysis of phagotyping for seventy-three phytopathogen strains against newly isolated isolates and four collection strains of bacteriophages, it was proposed to construct a phage cocktail including isolates BT2, SM10, Ph30–1, Ph44, DB1 and Tir2, with combined infectivity of 88% strains of the X. campestris pv. campestris collection, representative for the Russian population of the pathogen. Treatment of cabbage seeds of cv. “Moscow late 15” with 25.6% seeds naturally contaminated with the pathogen with the cocktail of 5 bacteriophages resulted in a significant decrease of the black rot infection of seedlings. The estimated biological efficacy of the bacteriophage cocktail reached 90.6%.

Key words: black rot, bacteriophages, phage cocktail, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

References

1. Bakteriofagi: biologiya i prakticheskoye primeneniye [Bacteriophages: biology and practical implications] / Ed. by E. Katter, A. Sulakvelidze // Translated from English by translators’ group; scientific editor – A.V. Letarov. – Moskva: Nauchnyy mir, 2012. – 640 p.
2. *Vo Tkhi Ngok Kha, Dzhaliyov F.S.* Antibakterial’naya aktivnost’ efirnykh masel i ikh ispol’zovaniye dlya obezzarazhivaniya semyan kapusty ot sosudistogo bakterioza [Antibacterial activity of essential oils and their use for disinfection of cabbage seeds from black rot] // *Izvestiya Timiryazevskoy sel’skokhozyaystvennoy akademii*. 2014. Issue 6. Pp. 59–68.
3. *Mazurin, Ye.S.* Metody diagnostiki vzbuditelya sosudistogo bakterioza kapusty i mery zashchity: dissertatsiya... kandidata biologicheskikh nauk: 06.01.11 [Methods of diagnosing the cabbage black rot agent and its control: PhD (Bio) thesis: 06.01.11] / Mazurin Yevgeniy Sergeevich; [Mesto zashchity: Ros. gos. agrar. un-t]. – Moskva, 2009. – 107 p.
4. *Nifontova V.V., Chugunova Ye.O.* Poluchenije bakteriofagov i ikh primeneniye v veterinarii [Isolation of bacteriophages and their application in veterinary medicine] // *Vestnik Permskogo nauchnogo tsentra*. 2015. No. 2. Pp. 54–59.
5. *Orynbayev A.T., Dzhaliyov F.S.* Obezzarazhivaniye semyan kapusty ot sosudistogo bakterioza [Disinfection of cabbage seeds from black rot] // *Kartofel’ i ovoshchi*. 2018. No. 1. Pp. 23–25.

6. *Orynbayev A.T., Dzhaliyov F.S. Zashchita rassady kapusty ot sosudistogo bakterioza [Protection of cabbage seedlings from vascular bacteriosis] / Mezhdunarodnaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya "Sovremennyye tekhnologii i sredstva zashchity rasteniy – platforma dlya innovatsionnogo osvoyeniya v APK Rossii". Materialy konferentsii, 8–12 October, 2018, SPb – Pushkin. 2018. Pp. 115–116.*

7. *Ackermann, H.–W. Basic Phage Electron Microscopy // Bacteriophages: Methods and Protocols. 2009. Vol. 1. Pp. 113–126.*

8. *Bradbury J.F. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. 1986. Slough: CAB International.*

9. *Dhar S., Singh D. Performance of cauliflower genotypes for yield and resistance against black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) // Indian J Hort. – 2014. – Vol. 71. – Pp. 197–201.*

10. *Incorporation, S. (2015). STATISTICA (data analysis software system) version 12.*

11. *Sneath P.H.A., Sokal R.R. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. 1973.*

12. *Vo Thi Ngok Ha, Dzhaliyov F.S., Ignatov A.N. Biological properties of bacteriophages specific to black rot pathogen of brassicas *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* // Izvestiya Timiryazevskoy sel'skokhozyaystvennoy akademii. 2015. Issue 6. Pp. 28–36.*

Орынбаев Аспен Турсынгаиевич – асп. кафедры защиты растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; (499) 976-1279; e-mail: aspen_kz@mail.ru).

Кабанова Анастасия Петровна – асп. Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10 (495) 335-55-88 e-mail: asiasay@yandex.ru).

Образцова Екатерина Александровна – к.ф.-м.н., руководитель группы электронной микроскопии Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10 (495) 336-19-88 e-mail: e.a.obraztsova@gmail.com).

Игнатов Александр Николаевич – Зам. ген. директора по научной работе, доктор биологических наук, ООО «Исследовательский Центр «ФитоИнженерия» (141880 Московская область, Рогачево, ул. Московская, 58); профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» (117198, г. Москва ул. Миклухо-Маклая, 6; e-mail: an.ignatov@gmail.com).

Мирошников Константин Анатольевич – д.х.н., г.н.с., зав. лабораторией молекулярной биоинженерии Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10 (495) 335-55-88, e-mail: kmi@ibch.ru).

Джалилов Февзи Сеид-Умерович – д.б.н., проф., зав. кафедрой защиты растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; (499) 976-1279; e-mail: labzara@mail.ru).

Aspen T. Orynbayev – postgraduate student, the Plant Protection Department, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49; (499) 976-1279; e-mail: aspen_kz@mail.ru).

Anastasiya P. Kabanova – postgraduate student, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, the Russian Academy of Sciences, (117997, Moscow, Miklukho-Maklaya Str., 16/10 (495) 335-55-88 e-mail: asiasay@yandex.ru).

Yekaterina A. Obraztsova – PhD (Phys-Math), Head of the Electron Microscopy Group, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, the Russian Academy of Sciences, (117997, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 16/10 (495) 336-19-88 e-mail: e.a.obraztsova@gmail.com).

Aleksandr N. Ignatov – PhD, DSc (Bio), Deputy General Director of LLC “Research Center “PhytoEngineering”, Moskovskaya Str. 58, 143880 Rogachevo, Moscow region, Russian Federation; Professor, Russian University of People’s Friendship, Miklukho-Maklay Str., 6, 117198, Moscow e-mail: an.ignatov@gmail.com.

Konstantin A. Miroshnikov – DSc (Chem), Head of the Molecular Bioengineering Laboratory, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, the Russian Academy of Sciences, (117997, Moscow, Miklukho-Maklaya Str., 16/10 (495) 335-55-88, e-mail: kmi@ibch.ru.

Fevzi S. Dzhalilov – DSc (Bio), Professor, Head of the Plant Protection Department, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49; (499) 976-1279; e-mail: labzara@mail.ru).