

---

---

# БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

---

## BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

---

---

УДК 579.64

### ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОДАВЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА БАКТЕРИОФАГАМИ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

**Н. В. БЕСАРАБ<sup>1)</sup>, А. Л. ЛАГОНЕНКО<sup>1)</sup>, М. А. ЛЕТАРОВА<sup>2)</sup>,  
А. К. ГОЛОМИДОВА<sup>2)</sup>, Е. Е. КУЛИКОВ<sup>2)</sup>, А. В. ЛЕТАРОВ<sup>2)</sup>, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ<sup>1)</sup>**

<sup>1)</sup>Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

<sup>2)</sup>Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского  
Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,  
пр. 60-летия Октября, 7, корп. 2, 117312, г. Москва, Россия

---

#### Образец цитирования:

Бесараб НВ, Лагоненко АЛ, Летарова МА, Голомидова АК, Куликов ЕЕ, Летаров АВ, Евтушенков АН. Исследование эффективности подавления бактериального ожога бактериофагами в лабораторных условиях. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;1:59–69.

#### For citation:

Besarab NV, Lagonenko AL, Letarova MA, Golomidova AK, Kulikov EE, Letarov AV, Evtushenkov AN. Study of the efficiency of suppressing fire blight by bacteriophages under laboratory conditions. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022; 1:59–69. Russian.

---

#### Авторы:

**Наталья Васильевна Бесараб** – аспирантка кафедры молекулярной биологии биологического факультета. Научный руководитель – А. Н. Евтушенков.

**Александр Леонидович Лагоненко** – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры молекулярной биологии биологического факультета.

**Мария Анатольевна Летарова** – младший научный сотрудник лаборатории вирусов микроорганизмов.

**Алла Константиновна Голомидова** – кандидат биологических наук; научный сотрудник лаборатории вирусов микроорганизмов.

**Евгений Евгеньевич Куликов** – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник, заместитель заведующего лабораторией вирусов микроорганизмов.

**Андрей Викторович Летаров** – доктор биологических наук; заведующий лабораторией вирусов микроорганизмов.

**Анатолий Николаевич Евтушенков** – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой молекулярной биологии биологического факультета.

#### Authors:

**Natalya V. Besarab**, postgraduate student at the department of molecular biology, faculty of biology.

*natal-vasilna@rambler.ru*

**Alexander L. Lagonenko**, PhD (biology), docent; associate professor at the department of molecular biology, faculty of biology.

**Maria A. Letarova**, junior researcher at the laboratory of microbial viruses.

**Alla K. Golomidova**, PhD (biology); researcher at the laboratory of microbial viruses.

**Evgeny E. Kulikov**, PhD (biology); senior researcher and deputy head of the laboratory of microbial viruses.

**Andrey V. Letarov**, doctor of science (biology); head of the laboratory of microbial viruses.

**Anatoly N. Evtushenkov**, doctor of science (biology), full professor; head of the department of molecular biology, faculty of biology.

В качестве биологического средства контроля бактериального ожога исследованы бактериофаги *Erwinia amylovora* Hena2, Roscha1, Pixel, Dichka и VyarbaS на модельных объектах – цветках и листьях груши. При обработке бактериофагом за 1 ч до инокуляции *E. amylovora* 1/79Sm статистически значимых отличий в симптомах по сравнению с контролем не обнаружено. Однако отмечено снижение титра патогена на 1–3 порядка при содержании в инокуляте  $10^6$ – $10^8$  КОЕ/мл *E. amylovora* и обработке бактериофагом за 1 ч до заражения патогеном.

**Ключевые слова:** бактериальный ожог; бактериофаги; *Erwinia amylovora*; груша; защита растений.

## STUDY OF THE EFFICIENCY OF SUPPRESSING FIRE BLIGHT BY BACTERIOPHAGES UNDER LABORATORY CONDITIONS

N. V. BESARAB<sup>a</sup>, A. L. LAGONENKO<sup>a</sup>, M. A. LETAROVA<sup>b</sup>,  
A. K. GOLOMIDOVA<sup>b</sup>, E. E. KULIKOV<sup>b</sup>, A. V. LETAROV<sup>b</sup>, A. N. EVTUSHENKOV<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Belarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

<sup>b</sup>Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Russian Academy of Sciences, 7 60-letiya Oktyabrya Avenue, 2 building, Moscow 117312, Russia

Corresponding author: N. V. Besarab (natal-vasilna@rambler.ru)

*Erwinia amylovora* bacteriophages Hena2, Roscha1, Pixel, Dichka and VyarbaS were studied as a biological fire blight control agents on model objects – pear flowers and leaves. When treated with a bacteriophage 1 h before inoculation with *E. amylovora* 1/79Sm, no statistically significant differences in symptoms were found compared to the control. However, a decrease in the titer of the pathogen by 1–3 orders of magnitude was shown with *E. amylovora* in the inoculum of  $10^6$ – $10^8$  CFU/mL and treatment with a bacteriophage 1 h before infection with the pathogen.

**Keywords:** fire blight; bacteriophages; *Erwinia amylovora*; pear; plant protection.

### Введение

Карантинный вид бактерий *Erwinia amylovora* – возбудитель бактериального ожога – имеет широкое географическое распространение и является вредоносным фитопатогеном, поражающим важные плодовые и декоративные культуры семейства Rosaceae. Наиболее восприимчивы к болезни молодые и интенсивно растущие растения. Первичное инфицирование происходит весной в период цветения. Перенос фитопатогена на растения осуществляется насекомыми или дождевой водой [1; 2]. Следует отметить, что распространение некроза по растению может проходить в течение всего лета [1]. Методами ПЦР, а также визуализации биолюминесценции и флуоресценции меченых клеток бактерий показано перемещение *E. amylovora* по растению из побегов в нижние части и корни [3; 4]. Кроме того, выявлены миграция *E. amylovora* и поражение надземных частей бактериальным ожогом при непосредственном заражении корней груши [5]. В связи с вышеперечисленными особенностями патогенеза *E. amylovora* эффективность контроля бактериального ожога будет зависеть от возможности подавления размножения бактерий в недоступных частях растений, где идет скрытое, бессимптомное развитие болезни. Методами контроля бактериального ожога традиционно являются агротехнические приемы и использование спреев химических агентов, таких как антибиотики и медьсодержащие соединения [6–8]. Успех применения химических агентов зависит от возможности обеспечения непосредственного их контакта с клетками фитопатогена, что осуществимо на эпифитной стадии болезни. Кроме того, несмотря на модификации способа доставки препарата химического агента в растение для контроля бактериального ожога (инъекции в ствол дерева), в литературе описана более низкая эффективность стволовых инъекций стрептомицина по сравнению с применением антибиотика в виде спрея [9]. Исследуемые в настоящее время естественные антагонисты бактерий – бактериофаги – обладают рядом преимуществ использования для контроля бактериозов по сравнению с химическими агентами. К преимуществам бактериофагов относятся природное происхождение, специфичность действия, присутствие в среде до элиминации бактерий-хозяев, способность к саморепликации [10]. Умножение числа бактериофагов при наличии бактерий-хозяев увеличивает шансы контакта бактериофага с бактериальными клетками. Кроме

того, в экспериментах по обработке корней, листьев и стеблей было показано перемещение бактериофагов *E. amylovora* в восходящем и нисходящем направлениях [11; 12], что позволяет предполагать перспективность использования бактериофагов для эндогенного контроля *E. amylovora*. Также в настоящее время исследователями рассматриваются ряд стратегий по преодолению возможных трудностей применения биопрепаратов на основе бактериофагов (подбор вирулентных бактериофагов с перекрестной специфичностью для коктейлей, разработка фотопротекторных смесей для аэрозолей биопрепаратов и т. д.) [13].

Необходимо отметить, что имеющихся на сегодняшний день экспериментальных данных по обработке растений бактериофагами в качестве средства борьбы с бактериальным ожогом недостаточно для подтверждения удовлетворительной эффективности препаратов на их основе. Кроме того, эксперименты в различных литературных источниках заметно отличаются как по времени обработки бактериофагом и способу внесения инокулята *E. amylovora*, так и по стартовым титрам суспензий бактериофага и бактерий [14–18]. Таким образом, настоящее исследование посвящено анализу способности бактериофагов подавлять развитие бактериального ожога. Цель работы – оценка эффективности контроля бактерии *E. amylovora* в лабораторных условиях с использованием пяти бактериофагов семейства Myoviridae (Hena2, Roscha1, Pixel, Dichka и VyarbaS), выделенных на территории Беларуси.

### Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили штамм фитопатогенной бактерии *E. amylovora* 1/79Sm [19] и проявляющие литическую активность в отношении данного штамма бактериофаги Hena2, Roscha1, Pixel, Dichka и VyarbaS, а также штамм эпифитной бактерии *Pantoea agglomerans* 216.

Культивирование бактерии-хозяина *E. amylovora* 1/79Sm и бактериофагов проводили при температуре 28 °С в питательной среде на основе пептона и дрожжевого экстракта (пептон – 10,0 г/л; дрожжевой экстракт – 5,0 г/л; NaCl – 8,5 г/л; вода дистиллированная – до 1 л) и в питательной среде LB (триптон – 10,0 г/л; дрожжевой экстракт – 5,0 г/л; NaCl – 10,0 г/л; вода дистиллированная – до 1 л).

Исследование эффективности подавления признаков бактериального ожога в лабораторных условиях проводили в мае 2020 и мае 2021 г. с использованием цветков и листьев груши. В табл. 1 представлена шкала баллов, которые были присвоены визуальным признакам поражения органов растений при заражении культурой бактерий *E. amylovora* в настоящем эксперименте. Также проведен анализ численности патогена на цветках при обработке бактериофагом. В экспериментах для получения фаголизатов использовали штамм бактерии *P. agglomerans* 216. Перед обработкой органов растений фаголизаты центрифугировали для освобождения от бактериального дебриса. При заражении органов растений *E. amylovora* культуру бактерий наносили на пестики цветков и центральную жилку листа и в точке инокуляции делали надрез. Результаты учитывали на 5-е сутки. В постановке экспериментов 2020 и 2021 гг. имелись отличия (табл. 2).

Таблица 1

**Четырехбалльная система оценки визуальных признаков поражения органов растений при заражении культурой бактерий *E. amylovora***

Table 1

**A four-point system for assessing symptoms of damage to plant organs when infected with *E. amylovora***

Визуальные признаки поражения груши возбудителем бактериального ожога		Балл
Цветки	Листья*	
Инфекция отсутствует	Инфекция отсутствует	0
Некроз затрагивает пестик	Некроз проявляется в точке инокуляции	1
Некроз затрагивает начало цветоложа	Некроз проявляется в точке инокуляции и затрагивает центральную жилку	2
Некроз поражает цветоложе	Некроз распространяется по центральной и дополнительным жилкам	3
Некроз захватывает часть цветоножки	Некроз затрагивает более 50 % поверхности листа	4

\*По данным [20].

Для анализа количества КОЕ и БОЕ на цветках груши последние на 1 ч помещали в 1мл физиологического раствора, после чего полученную суспензию титровали и высевали на чашки с питательным агаром с добавлением стрептомицина в концентрации 25 мкг/мл.

Эксперименты ставились с проведением двух контролей. Для первой контрольной группы (далее – **контроль 1** и **контроль** в экспериментах 2020 и 2021 гг. соответственно) использовали среду LB, а вторую контрольную группу (далее – **контроль 2** в эксперименте 2020 г.; **1/79Sm (т. 1)**, **1/79Sm (т. 2)** и **1/79Sm (т. 3)** в эксперименте 2021 г.) заражали культурой бактерий *E. amylovora* 1/79Sm, при этом обработку бактериофагом не выполняли. При заражении органов растений культурой бактерий *E. amylovora* 1/79Sm в эксперименте 2021 г. использовали инокулят различного титра, для чего отбор суспензии клеток растущей культуры бактерий проводили в разные временные точки (т. 1, т. 2 или т. 3).

Таблица 2

Условия экспериментов исследования эффективности контроля *E. amylovora* при обработке органов растений бактериофагами

Table 2

Conditions of experiments on disease control by bacteriophages on plant organs infected with *E. amylovora*

Номер опыта	Год	Титр бактерий в инокуляте, КОЕ/мл	Титр бактериофага в фаголизате, БОЕ/мл	Порядок обработки	Средняя температура окружающей среды, °С
1	2020	$1 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^8$	На цветки и листья распыляли бактериофаг, спустя 1 ч проводили инокуляцию бактерий	23,5
2	2021	$5 \cdot 10^6$ (т. 1) $1 \cdot 10^7$ (т. 2) $2,6 \cdot 10^7$ (т. 3)	$5 \cdot 10^9$	На цветки и листья распыляли бактериофаг, спустя 1 ч проводили инокуляцию бактерий	21,5

Эксперименты выполняли не менее чем в трех повторах. Для статистической обработки данных использовали встроенные функции программы *Microsoft Excel*. Планки погрешностей на рис. 1–4 отражают величину стандартного отклонения.

## Результаты и их обсуждение

В настоящей работе проведено исследование эффективности подавления развития бактериального ожога на модельных объектах – цветках и листьях груши. Масштабы тестирования средств борьбы с бактериальным ожогом на растениях ограничены трудоемкостью и продолжительностью возделывания древесных культур [21]. В связи с этим необходимо использовать адекватные модели заражения растений в лабораторных условиях. Первичным органом заражения является цветок [2], поэтому эксперименты на цветках представляют собой наиболее показательную модель заражения бактериальным ожогом. Одно из самых чувствительных растений к патогену *E. amylovora* – груша, по этой причине тестирование антибактериальных агентов чаще всего проводят на ее цветках [22; 23]. Для установления возможности распространения бактерий и бактериофага в тканях растений в качестве упрощенной модели также можно использовать молодые листья растений. Например, отделенные листья груши применяли ранее для выявления чувствительности сортов груши и вирулентности патогенов *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* при проведении анализа прогрессирования зоны некроза [20], а для оценки агрессивности патогена *E. amylovora* и его способности к миграции осуществляли заражение листьев саженцев яблони GFP-мечеными клетками бактерий [24]. В настоящее время имеются данные по изучению подавления бактериофагами *E. amylovora* развития бактериального ожога на цветках груши, яблони и айвы (табл. 3). Следует отметить, что при оценке способности бактериофагов подавлять развитие болезни в исследованиях анализировали численность патогена на цветках (в работе [14] – симптомы болезни). В экспериментах использовались бактериофаги семейств Myoviridae и Podoviridae, причем наилучший результат со снижением титра фитопатогена на несколько порядков показан для рекомбинантного бактериофага Y2::*dpoL1-C*, представляющего собой миовирус, несущий ген деполимеразы подовируса L1 [17].

Эксперименты по обработке бактериофагами  
цветков, зараженных возбудителем бактериального ожога

Table 3

Experiments on disease control by bacteriophages  
on flowers infected with the causative agent of fire blight

Штамм-носитель для наработки бактериофага	Последовательность обработки и титр* фаговых и бактериальных компонентов	Эффективность обработки бактериофагом	Источник
<i>P. agglomerans</i> Eh21-5	Бактериофаг и культуру бактерий <i>P. agglomerans</i> смешивали в соотношении $10^8$ КОЕ/мл : $10^8$ БОЕ/мл и оставляли инкубироваться на 1 ч. Суспензию фага и <i>P. agglomerans</i> распыляли на цветки груши и давали высохнуть в течение 3 ч перед инокуляцией суспензии культуры бактерий <i>E. amylovora</i> ( $10^6$ КОЕ/мл)	Снижение симптомов инфекции на 60 и 84–96 %	[14]
<i>E. amylovora</i>	На рыльце цветков яблони инокулировали суспензию <i>E. amylovora</i> 1/79Sm ( $5 \cdot 10^3$ КОЕ) и бактериофагов ( $5 \cdot 10^7$ – $1 \cdot 10^8$ БОЕ)	Снижение численности патогена на 40–90 %	[15]
<i>E. amylovora</i>	На цветки яблони распыляли фаголизат ( $10^{12}$ БОЕ/мл) и инокулировали суспензию ночной культуры бактерий <i>E. amylovora</i> 1/79Sm ( $10^5$ КОЕ/мл) в количестве 10 мкл на цветок	Снижение численности патогена более чем на 45 %	[16]
<i>E. amylovora</i>	На цветки яблони распыляли разное количество культуры бактерий <i>E. amylovora</i> ( $10^2$ ; $10^4$ ; $10^6$ КОЕ/мл). Через 1 ч распыляли бактериофаги ( $3 \cdot 10^8$ БОЕ/мл)	Снижение числа клеток патогена на 6,0; 3,6 и 2,9 порядка на цветках, инокулированных $10^2$ ; $10^4$ и $10^6$ КОЕ/мл, соответственно	[17]
<i>E. amylovora</i>	Смесь 1 : 1 фаголизата ( $10^{10}$ БОЕ/мл) и суспензии культуры бактерий <i>E. amylovora</i> 1/79Sm ( $10^5$ КОЕ/мл) объемом 20 мкл наносили на пестики цветков яблони и айвы	Снижение численности патогена на 65–84 % (0,5–1,0 порядка)	[18]

\*Выделен полужирным начертанием.

В настоящем исследовании с участием пяти бактериофагов семейства Muoviridae сезонные эксперименты 2020 и 2021 гг. имели методические модификации и продемонстрировали различные результаты при оценке подавления бактериального ожога в лабораторных условиях (см. рис. 1–4).

В эксперименте 2020 г. (см. рис. 1) при визуальной оценке симптомов поражения цветков груши бактериальным ожогом статистически значимой разницы между **контролем 2** и обработанными бактериофагом цветками не выявлено. Полученные данные свидетельствуют о потенциально низкой эффективности каждого из исследуемых бактериофагов и коктейля фагов в условиях стремительно развивающейся болезни, когда обработка бактериофагом происходит после попадания на цветок растения инокулята с высоким значением КОЕ. Следует отметить, что титр  $10^8$  КОЕ/мл на 2 и более порядка превышает таковой в проведенных ранее исследованиях (см. табл. 3). Ряд экспериментов свидетельствуют о наличии критического порога в соотношении бактерии и бактериофага, выше которого эффективность применения бактериофага значительно падает [17].

Диапазон разброса данных при обработке отдельными бактериофагами (Hena2 ( $1,50 \pm 1,05$ ), Roschal ( $1,67 \pm 1,03$ ), Pixel ( $1,83 \pm 0,75$ ), Dichka ( $1,83 \pm 0,98$ ) и VyarbaS ( $1,67 \pm 1,03$ )) был ниже среднего балла оценки визуальных признаков поражения для **контроля 2** ( $2,83 \pm 0,98$ ). В случае применения коктейля фагов статистически значимой разницы с **контролем 2** не наблюдалось.

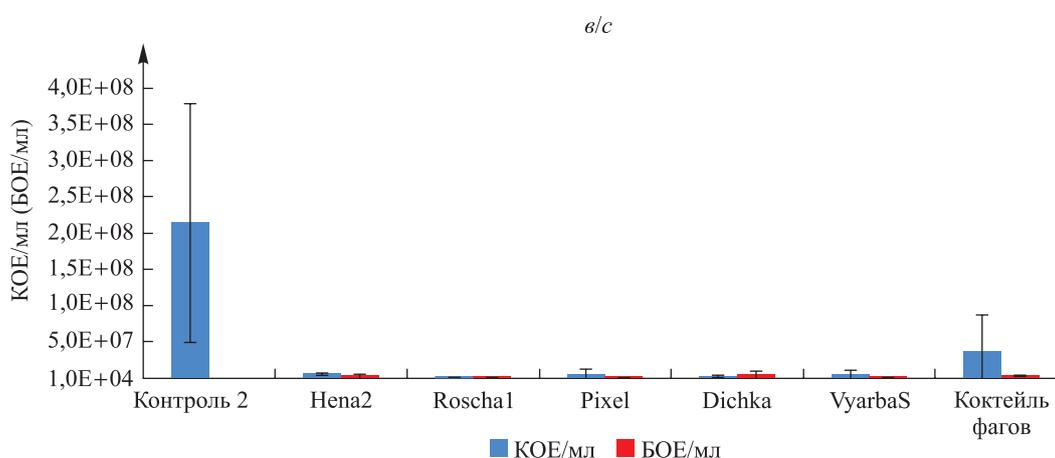
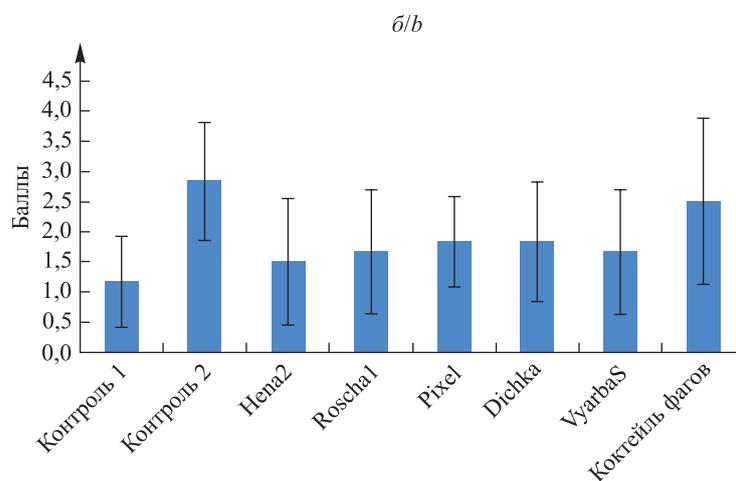


Рис. 1. Анализ поражения цветков груши после заражения *E. amylovora* и обработки бактериофагами в 2020 г.:  
 а – цветки груши на 5-е сутки инкубирования;  
 б – оценка визуальных признаков поражения цветков груши;  
 в – титр патогена и бактериофага на цветках на 5-е сутки инкубирования

Fig. 1. Analysis of damage to pear flowers after infection with *E. amylovora* and treatment with bacteriophages in 2020:  
 a – pear flowers on the 5<sup>th</sup> day of incubation; b – assessment of symptoms on pear flowers;  
 c – the pathogen and bacteriophage titer on flowers on the 5<sup>th</sup> day of incubation

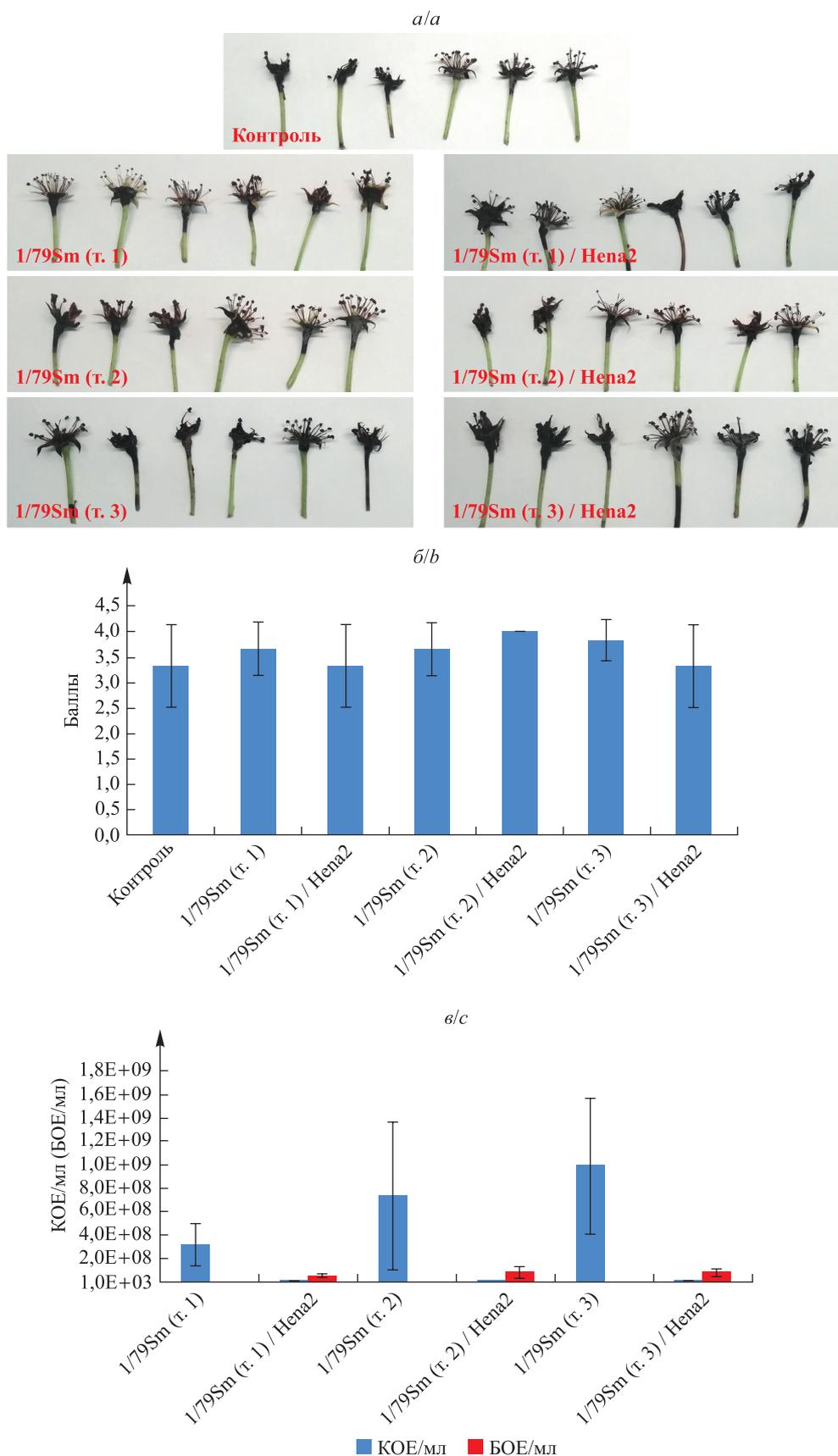
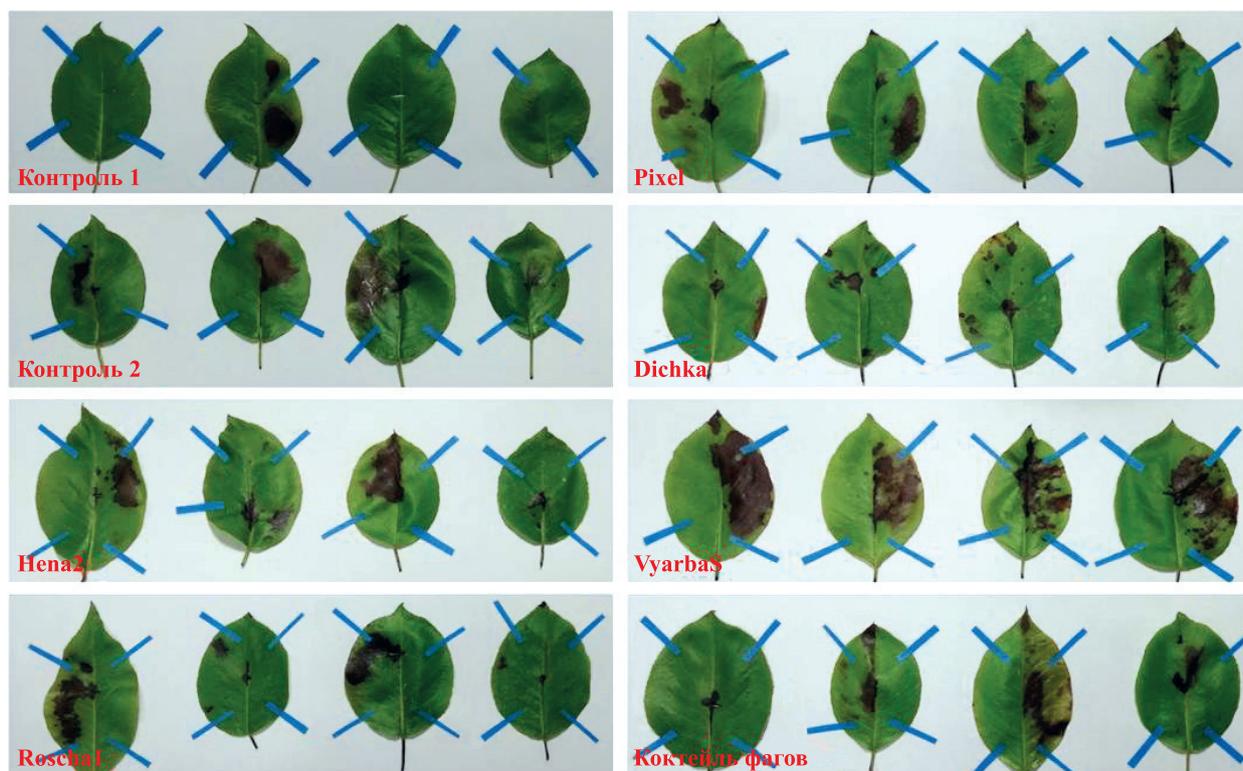


Рис. 2. Анализ поражения цветков груши после заражения *E. amylovora* и обработки бактериофагом Hena2 в 2021 г.:  
a – цветки груши на 5-е сутки инкубирования; б – оценка визуальных признаков поражения цветков груши;  
в – титр патогена и бактериофага на цветках на 5-е сутки инкубирования

Fig. 2. Analysis of damage to pear flowers after infection with *E. amylovora* and treatment with bacteriophage Hena2 in 2021: a – pear flowers on the 5<sup>th</sup> day of incubation;  
b – assessment of symptoms on pear flowers; c – the pathogen and bacteriophage titer on flowers on the 5<sup>th</sup> day of incubation

a/a



b/b

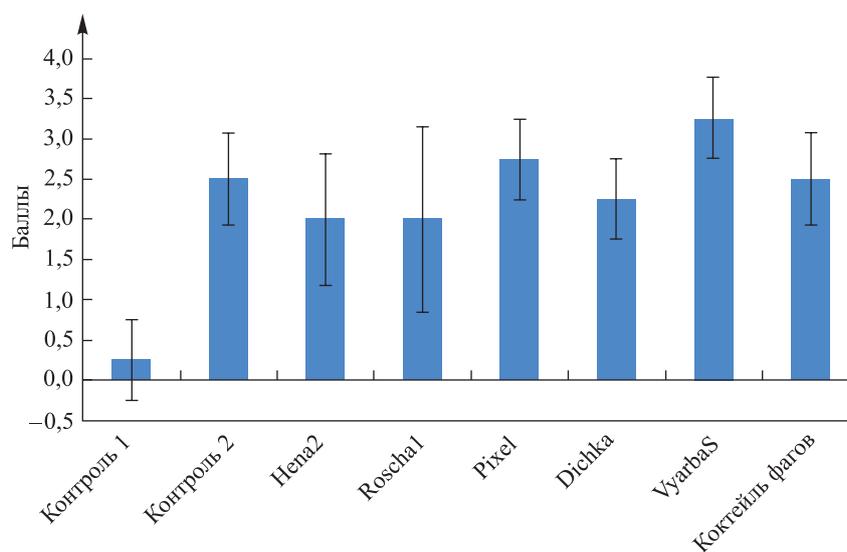


Рис. 3. Анализ поражения листьев груши после заражения *E. amylovora* и обработки бактериофагами в 2020 г.: а – листья груши на 5-е сутки инкубирования; б – оценка визуальных признаков поражения листьев

Fig. 3. Analysis of damage to pear leaves after infection with *E. amylovora* and treatment with bacteriophages in 2020: a – pear leaves on the 5<sup>th</sup> day of incubation; b – assessment of symptoms on pear leaves

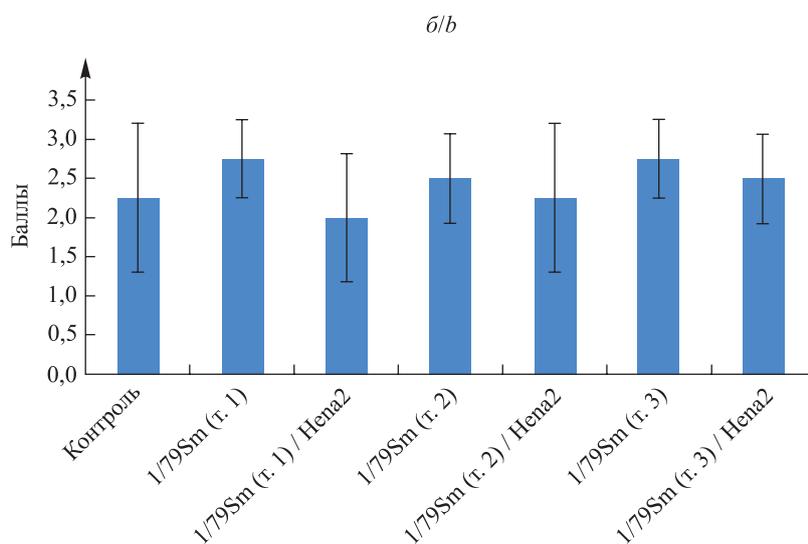
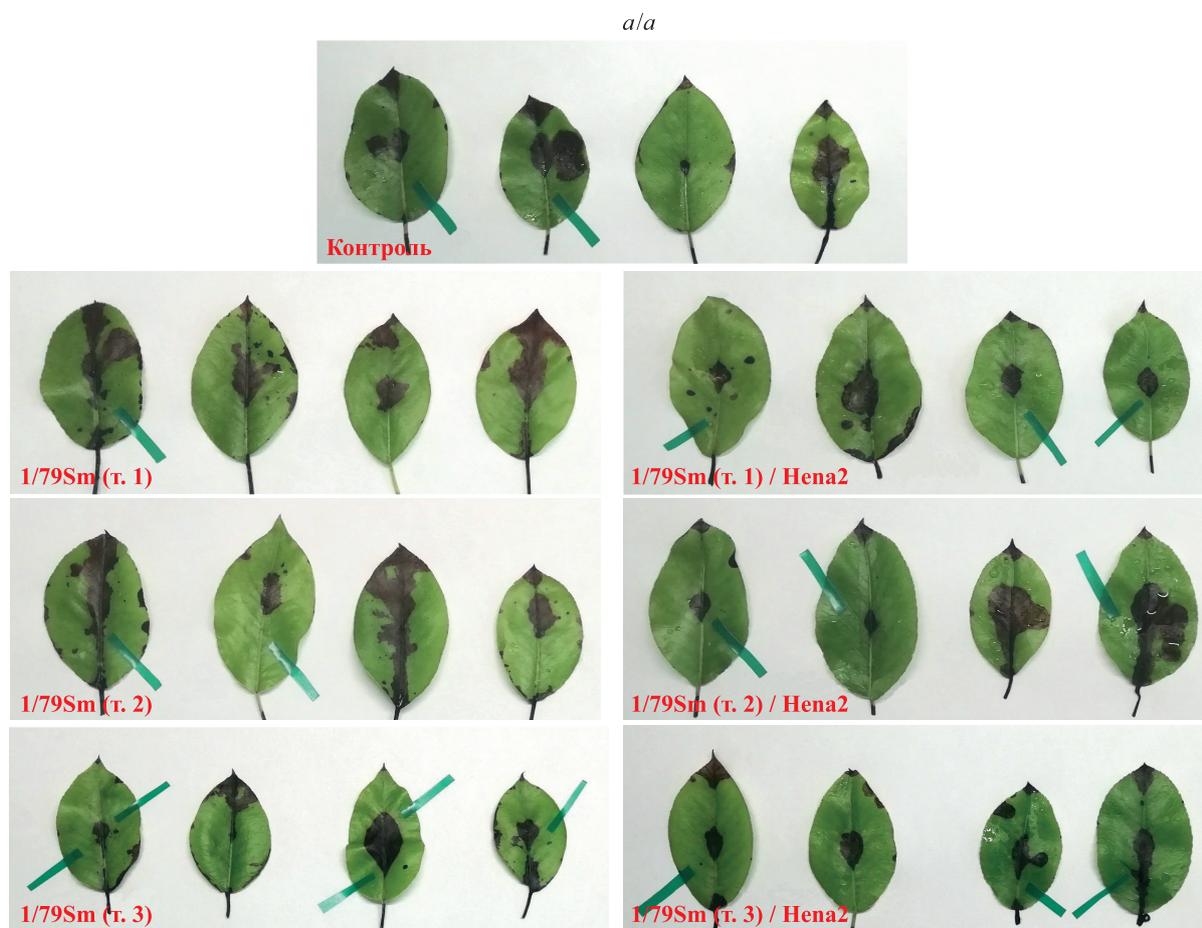


Рис. 4. Анализ поражения листьев груши после заражения *E. amylovora* и обработки бактериофагом Hena2 в 2021 г.: *a* – листья груши на 5-е сутки инкубирования; *б* – оценка визуальных признаков поражения листьев

Fig. 4. Analysis of damage to pear leaves after infection with *E. amylovora* and treatment with Hena2 bacteriophage in 2021: *a* – pear leaves on the 5<sup>th</sup> day of incubation; *b* – assessment of symptoms on pear leaves

Необходимо отметить, что органы растений **контроля 1** и **контроля** в экспериментах 2020 и 2021 гг. также имели достаточно высокий балл некроза тканей (см. рис. 1–4), что может свидетельствовать о негативном влиянии компонентов питательных сред и (или) эпифитной флоры на ткани растений. В связи с этим для получения более полного представления о способности бактериофагов подавлять рост популяции *E. amylovora* на цветках груши в 2020 и 2021 гг. проведен анализ численности бактерий *E. amylovora* 1/79Sm и бактериофагов. В эксперименте 2020 г. (см. рис. 1, в) после 5 сут инкубирования на цветках наблюдали соответствующее снижение титра патогена при обработке отдельными бактериофагами по сравнению с **контролем 2**: Hena2 – в 40,75 раза, Roscha1 – в 984,15, Pixel – в 44,12, Dichka – в 137,27, VyarbaS – в 47,39 раза. Титр бактериофага (БОЕ/мл) во всех случаях, кроме группы, обработанной бактериофагом Dichka, был ниже титра бактерий (КОЕ/мл). Так, с цветков, обработанных бактериофагом Hena2, высевали  $2,4 \cdot 10^6 \pm 2,4 \cdot 10^6$  БОЕ/мл и  $5,2 \cdot 10^6 \pm 1,6 \cdot 10^6$  КОЕ/мл, Roscha1 –  $7,6 \cdot 10^4 \pm 1,2 \cdot 10^5$  БОЕ/мл и  $2,2 \cdot 10^5 \pm 1,0 \cdot 10^5$  КОЕ/мл, Pixel –  $2,0 \cdot 10^5 \pm 1,8 \cdot 10^5$  БОЕ/мл и  $4,8 \cdot 10^6 \pm 6,6 \cdot 10^6$  КОЕ/мл, Dichka –  $3,4 \cdot 10^6 \pm 5,2 \cdot 10^6$  БОЕ/мл и  $1,6 \cdot 10^6 \pm 1,4 \cdot 10^6$  КОЕ/мл, VyarbaS –  $8,5 \cdot 10^4 \pm 1,1 \cdot 10^5$  БОЕ/мл и  $4,5 \cdot 10^6 \pm 6,5 \cdot 10^6$  КОЕ/мл, коктейлем фагов –  $2,5 \cdot 10^6 \pm 9,5 \cdot 10^5$  БОЕ/мл и  $3,6 \cdot 10^7 \pm 5,2 \cdot 10^7$  КОЕ/мл.

В эксперименте 2021 г. (см. рис. 2) проведено исследование эффективности подавления развития бактериального ожога бактериофагом Hena2 при более низком значении количества КОЕ *E. amylovora* 1/79Sm в инокуляте (см. табл. 2). При анализе визуальных признаков поражения цветков статистически значимых отличий между **контролем**, **1/79Sm (г. 1)**, **1/79Sm (г. 2)**, **1/79Sm (г. 3)** и обработанными бактериофагом цветками не выявлено. Однако показатель снижения численности патогена был выше, чем в эксперименте 2020 г.: количество КОЕ на обработанных бактериофагом Hena2 цветках оказалось в 67; 2164 и 247 раз ниже, чем для **1/79Sm (г. 1)**, **1/79Sm (г. 2)** и **1/79Sm (г. 3)** соответственно. Титр бактериофага на цветках после 5 сут инкубирования также был выше в эксперименте 2021 г. (на 1–3 порядка).

При исследовании прогрессирования некроза у листьев груши (см. рис. 3, 4) наблюдали развитие поражения растительной ткани для всех групп листьев, на которые производили инокуляцию патогена *E. amylovora* 1/79Sm. Статистически значимых отличий между результатами для **контроля 2 (1/79Sm (г. 1))**, **1/79Sm (г. 2)**, **1/79Sm (г. 3)** и обработанных бактериофагом групп листьев не обнаружено.

Необходимо отметить, что в эксперименте 2021 г. листья груши в **контроле** также имели высокий балл некроза тканей, что говорит о возможной интерференции результатов, обусловленной влиянием на ткани растений компонентов питательных сред, используемых для приготовления препарата бактериофага, и эпифитной флоры.

## Заключение

В работе исследована способность бактериофагов Hena2, Roscha1, Pixel, Dichka и VyarbaS подавлять развитие бактериального ожога при заражении органов растений культурой бактерий *E. amylovora* 1/79Sm. Статистически значимых отличий при оценке симптомов болезни не обнаружено, однако получены сравнительно высокие значения подавления численности патогена на цветках груши (см. табл. 3). Наилучший результат наблюдали при обработке бактериофагом за 1 ч до внесения инокулята *E. amylovora* более низкой плотности (эксперимент 2021 г.): количество КОЕ *E. amylovora* уменьшалось на 2–3 порядка, что выше результатов в литературных источниках или сопоставимо с ними. Наличие жизнеспособных клеток бактерий *E. amylovora* может быть обусловлено фагорезистентными вариантами или экологическими особенностями бактериофагов, что представляет интерес для дальнейших исследований.

## Библиографические ссылки / References

1. Vrancken K, Holtappels M, Schoofs H, Deckers T, Valcke R. Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in Rosaceae: state of the art. *Microbiology*. 2013;159(part 5):823–832. DOI: 10.1099/mic.0.064881-0.
2. Johnson KB. Fire blight of apple and pear. *The Plant Health Instructor* [Internet]. 2000 [cited 2021 August 24]. Available from: <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/prokaryote/pdlessons/Pages/FireBlight.aspx>. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0726-01.
3. Bogs J, Bruchmüller I, Erbar C, Geider K. Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence. *Phytopathology*. 1998;88(5):416–421. DOI: 10.1094/PHYTO.1998.88.5.416.
4. Momol MT, Norelli JL, Piccioni DE, Momol EA, Gustafson HL, Cummins JN, et al. Internal movement of *Erwinia amylovora* through symptomless apple scion tissues into the rootstock. *Plant Disease*. 1998;82(6):646–650. DOI: 10.1094/PDIS.1998.82.6.646.
5. Santander RD, Català-Senent JF, Figàs-Segura À, Biosca EG. From the roots to the stem: unveiling pear root colonization and infection pathways by *Erwinia amylovora*. *FEMS Microbiology Ecology*. 2020;96(12):fiae210. DOI: 10.1093/femsec/fiae210.
6. Gusberti M, Klemm U, Meier MS, Maurhofer M, Hunger-Glaser I. Fire blight control: the struggle goes on. A comparison of different fire blight control methods in Switzerland with respect to biosafety, efficacy and durability. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2015;12(9):11422–11447. DOI: 10.3390/ijerph120911422.

7. CABI. *Erwinia amylovora* (fireblight) [Internet]. In: *Invasive species compendium*. Wallingford: CAB International; 2021 [cited 2021 August 24]. Available from: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/21908>.
8. Dagher F, Olishevskaya S, Phillion V, Jie Zheng, Déziel E. Development of a novel biological control agent targeting the phytopathogen *Erwinia amylovora*. *Heliyon*. 2020;6(10):e05222. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e05222.
9. Aćimović SG, Quan Zeng, McGhee GC, Sundin GW, Wise JC. Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Frontiers in Plant Science*. 2015;6:16. DOI: 10.3389/fpls.2015.00016.
10. Jones JB, Jackson LE, Balogh B, Obradovic A, Iriarte FB, Momol MT. Bacteriophages for plant disease control. *Annual Review of Phytopathology*. 2007;45:245–262. DOI: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094411.
11. Doffkay Z, Dömötör D, Kovács T, Rákhely G. Bacteriophage therapy against plant, animal and human pathogens. *Acta Biologica Szegediensis*. 2015;59(supplement 2):291–302.
12. Nagy JK, 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. *European Journal of Plant Pathology*. 2015;142(4):815–827. DOI: 10.1007/s10658-015-0654-3.
13. Nagy JK, Király L, Schwarczinger I. Phage therapy for plant disease control with a focus on fire blight. *Central European Journal of Biology*. 2012;7(1):1–12. DOI: 10.2478/s11535-011-0093-x.
14. 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. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2011;33(3):308–317. DOI: 10.1080/07060661.2011.588250.
15. Müller I, Lurz R, Kube M, Quedenau C, Jelkmann W, Geider K. Molecular and physiological properties of bacteriophages from North America and Germany affecting the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Microbial Biotechnology*. 2011;4(6):735–745. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2011.00272.x.
16. Schwarczinger I, Kiss E, Süle S, Tóth M, Hevesi M. Control of fire blight by bacteriophages on apple flowers. In: Sobiczewski P, Kaluzna M, Pulawska J, editors. *Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Workshop on Fire Blight; 2010 August 16–20; Warsaw, Poland*. [S. l.]: International Society for Horticultural Science; 2011. p. 457–462 (Acta Horticulturae; volume 896). DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.896.66.
17. Born Y, Fieseler L, Thöny V, Leimer N, Duffy B, Loessner MJ. Engineering of bacteriophages Y2::*dpoL1-C* and Y2::*luxAB* for efficient control and rapid detection of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2017; 83(12):e00341-17. DOI: 10.1128/AEM.00341-17.
18. Schwarczinger I, Nagy JK, Künstler A, Szabó L, Geider K, Király L, et al. Characterization of Myoviridae and Podoviridae family bacteriophages of *Erwinia amylovora* from Hungary – potential of application in biological control of fire blight. *European Journal of Plant Pathology*. 2017;149(3):639–652. DOI: 10.1007/s10658-017-1214-9.
19. Bellemann P, Bereswill S, Berger S, Geider K. Visualization of capsule formation by *Erwinia amylovora* and assays to determine amylovoran synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1994;16(6):290–296. DOI: 10.1016/0141-8130(94)90058-2.
20. Moragrega C, Llorente I, Manceau C, Montesinos E. Susceptibility of European pear cultivars to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* using immature fruit and detached leaf assays. *European Journal of Plant Pathology*. 2003;109(4):319–326. DOI: 10.1023/A:1023574219069.
21. Ferree DC, Warrington IJ, editors. *Apples: botany, production and uses*. Cambridge: CABI Publishing; 2003. XI, 660 p. DOI: 10.1079/9780851995922.0000.
22. Teviotdale BL. *Fire blight* [Internet]. Davis: University of California; 2011 [cited 2021 August 24]. Available from: <http://ipm.ucanr.edu/PDF/PESTNOTES/pnfireblight.pdf> (Pest notes; 7414).
23. Evans K, Frank E, Beddes T, Pace M, Shao M, Moulton A. *Fire blight* [Internet]. Logan: Utah State University Extension; 2008 [cited 2021 August 24]. Available from: <https://extension.usu.edu/files-ou/publications/factsheet/fire-blight-08.pdf>. Co-published by the Utah Plant Pest Diagnostic Laboratory.
24. Bogs J, Richter K, Kim W-S, Jock S, Geider K. Alternative methods to describe virulence of *Erwinia amylovora* and host-plant resistance against fireblight. *Plant Pathology*. 2004;53(1):80–89. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2004.00954.x.

Получена 09.09.2021 / исправлена 22.01.2022 / принята 22.01.2022.  
Received 09.09.2021 / revised 22.01.2022 / accepted 22.01.2022.