СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2020, том 55, № 1, с. 87-96

УДК 635.21:632.7:632.937.15 doi: 10.15389/agrobiology.2020.1.87rus

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОМА ШТАММА *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* 56 И ИЗУЧЕНИЕ ИНСЕКТИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ЕГО ОСНОВЕ*

М.Е. БЕЛОУСОВА[1], С.Д. ГРИШЕЧКИНА[1], В.П. ЕРМОЛОВА[1], К.С. АНТОНЕЦ[1], А.В. МАРДАНОВ[2], А.Л. РАКИТИН[2], А.В. БЕЛЕЦКИЙ[2], Н.В. РАВИН[2], А.А. НИЖНИКОВ[1]

Полифункциональные микробиологические препараты перспективны в использовании для защиты растений, поскольку обладают многоплановым действием, включающим ростостимулирующий эффект, комплексную антифунгальную и инсектицидную активность. Один из ключевых микроорганизмов, используемых в качестве основы для создания биологических препаратов, — грамположительная спорообразующая бактерия *Bacillus thuringiensis* (Bt). Высокая специфичность действия и экологическая безопасность препаратов на основе Bt способствуют поддержанию биоценотического равновесия и позволяют сократить количество обработок, а также получить экологически чистую продукцию. Во Всероссийском НИИ сельскохозяйственной микробиологии был выделен и селектирован штамм *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* 56 (BtH_{10} 56), в лабораторных условиях проявлявший инсектицидное действие на личиночные стадии листогрызущих насекомых-вредителей, ростостимулирующую активность в отношении картофеля и других сельскохозяйственных культур, а также антифунгальный эффект против ряда фитопатогенных грибов. В настоящей работе впервые проведено секвенирование и аннотация полного генома штамма продуцента BtH_{10} 56, выявлены факторы, обусловливающие инсектицидную и антифунгальную активность этого штамма, а также показана высокая эффективность биологического препарата на его основе в полевых условиях против колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say. Цель работы — выявление молекулярных детерминант инсектицидных свойств штамма-продуцента *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* 56, а также испытание его активности в полевых условиях. Полевые испытания эффективности биопрепарата на основе штамма *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* 56 (BtH_{10} 56) против колорадского жука проводили на картофеле (*Solanum tuberosum* L.) сортов Винета и Рокко в 2018 и 2019 годах (ООО «МТС-Агро», Воронежская обл.) на площади 1 га. Для оценки энтомоцидной активности использовали жидкую форму препарата на основе штамма, наработанного в филиале ФГБНУ ВНИИСХМ «Экос» (титр спор 2,12-2.3×10^9 КОЕ/мл) на дрожже-полисахаридной среде в ферментерах объемом 100 л. Норма применения препарата — 20 л/га. Посадки картофеля обрабатывали с использованием опрыскивателя ОПГ-2000 (ООО «Заря», Россия). В качестве химического эталона использовали инсектицидные препараты Цепеллин, КЭ и Колорадо, ВРК (ООО «Агро Эксперт Груп», Россия) в дозах соответственно 100 г/л и 0,1 л/га. Учеты проводили перед и после обработки (на 5-е, 10-е и 14-е сут). Биологическую эффективность препарата определяли по снижению численности вредителя по формуле Abbott. По результатам испытаний была установлена высокая эффективность разработанного препарата против колорадского жука, которая на 10-е сут составляла 83,8-87,8 % и не отличалась от химического эталона. С использованием технологии Illumina («Illumina, Inc.», США) и мономолекулярного нанопорового секвенирования («Oxford Nanopore», Великобритания) была получена полная последовательность генома штамма-продуцента BtH_{10} 56. Для поиска и классификации генов инсектицидных токсинов Bt использовали программы CryProcessor и BtToxin_scanner, в результате чего был идентифицирован ген *cry1Ea7*, относящийся к группе *cry1E*, для которой описана активность в отношении различных чешуекрылых (*Lepidoptera*). Исследованный штамм не содержал генов, кодирующих токсины групп Vip, Sip и Cyt, однако нес ряд генов, кодирующих синтетазы нерибосомно синтезируемых пептидов (*nrp*), что объясняет его полифункциональные свойства. Полученные данные позволяют рекомендовать биологический препарат на основе BtH_{10} 56 для использования в промышленности и органическом земледелии.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis*, инсектицидная активность, экзотоксин, эндотоксин, Oxford Nanopore, Illumina, токсин Cry, Bt, колорадский жук, *Leptinotarsa decemlineata*.

Bacillus thuringiensis (Bt) — спорообразующая почвенная бактерия,

* Работы по полногеномному секвенированию проведены при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Аннотация токсинов и факторов вирулентности выполнена при поддержке РНФ, грант № 18-76-00028.

широко используемая в качестве биологического агента защиты растений. В настоящее время описаны около 100 подвидов этой бактерии, выделенных по всему миру из разных источников — насекомых, почвы, растительных остатков, водных резервуаров (1, 2). Успешные коммерческие продукты были разработаны на основе подвидов *kurstaki*, *aizawai*, *san diego*, *tenebrionis* для защиты от насекомых — вредителей сельскохозяйственных культур (3, 4), а также подвида *israelensis* для защиты от кровососущих двукрылых (5). В Российской Федерации в настоящее время производят препараты только на основе двух подвидов Bt — *kurstaki* и *thuringiensis* (6).

Биопрепараты на основе штаммов Bt содержат в качестве действующего вещества спорово-кристаллический комплекс и ряд других метаболитов. Штаммы некоторых разновидностей в процессе роста и развития образуют и выделяют в питательную среду термостабильный водорастворимый экзотоксин (β-экзотоксин). Спектр действия экзотоксина значительно шире, чем спорово-кристаллического комплекса (7, 8). Экзотоксин может действовать не только при заражении перорально, но и контактно через покровы насекомых, а в комбинации со спорово-кристаллическим комплексом выполнять функции синергиста. Содержащие экзотоксин препараты Bt используют для снижения численности чешуекрылых насекомых, а также представителей отрядов *Coleoptera* и *Diptera*. Наличие в препарате Bt трех основных энтомоцидных компонентов (спор, δ-эндотоксина и β-экзотоксина) не только усиливает их энтомоцидный эффект, но и расширяет спектр действия (9, 10).

Подвид *darmstadiensis* был впервые выделен в Германии из личинок пчелиной огневки *Galleria mellonella* в 1968 году (11). Известно, что некоторые его штаммы содержат инсектицидные токсины группы Cry1 (от «crystal» — кристалл), активные в отношении представителей отряда чешуекрылых: *Bombyx mori*, *Lambdina fiscellaria*, *Malacosoma disstria*, *Choristoneura fumiferana* (12), *Anticarsia gemmatalis* (13). Несмотря на перспективность использования подвида *darmstadiensis* в сельском хозяйстве и биотехнологии, пока нет зарегистрированных коммерческих препаратов на основе его штаммов.

Ранее нами был проведен скрининг природных изолятов Bt, в результате которого отобраны вирулентные штаммы *B. thuringiensis* var. *darmstadiensis* (BtH_{10}). BtH_{10} 56 выделен из трупов колорадского жука в Ленинградской области, после чего была проведена многоступенчатая селекция на физиологические и хозяйственно ценные свойства (14). Лабораторные испытания показали высокую энтомоцидную активность штамма в отношении личиночных стадий колорадского жука и картофельной коровки, а также антифунгальную активность против различных фитопатогенных грибов, включая *Botrytis cinerea*, *Pythium* spp., *Bipolaris sorokiniana*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*. Помимо этого, штамм BtH_{10} 56 проявляет ростостимулирующий эффект, увеличивая зеленую массу и повышая урожайность у картофеля, улучшая всхожесть семян у капусты, томата, огурцов, кабачков, свеклы. Показатели ростостимулирующего действия BtH_{10} 56 превышают таковые у штамма-прототипа BtH_{10} № 25 (15).

Картофель — одна из основных производственных культур в Российской Федерации. Потери урожая картофеля, вызванные самым опасным его вредителем — колорадским жуком, могут достигать 40-50 % (16). Потребность в экологически чистой продукции делает все более привлекательными биологические малоопасные препараты для защиты растений.

Применение химических пестицидов оказывает отрицательное действие на окружающую среду и нарушает экологические связи между организмами. Специфичные по своему действию биологические препараты — перспективный вариант защиты растений ввиду их безопасности для нецелевой биоты, наличие которой, в свою очередь, упрощает процесс сдерживания численности вредителей ниже экономического порога вредоносности. Использование естественных механизмов регуляции наряду с микробиологическим контролем позволяет получать экологически чистую продукцию в рамках устойчивых агроэкосистем. Препарат на основе штамма бактерий BtH_{10} 56, кроме выраженной энтомоцидной активности в отношении личиночных стадий листогрызущих вредителей, обладает высокой антифунгальной активностью против различных фитопатогенных грибов, а также ростостимулирующим действием (15).

В представленной работе впервые проведено секвенирование и аннотация полного генома у штамма-продуцента BtH_{10} 56, выявлены факторы, обусловливающие его инсектицидную и антифунгальную активность, а также показана высокая эффективность биологического препарата на основе этого штамма против колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say в полевых условиях.

Цель работы — выявление молекулярных детерминант инсектицидных свойств штамма-продуцента *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* 56 и испытание его активности в полевых условиях.

Методика. Для расшифровки полного генома штамма BtH_{10} 56 использовали технологии Illumina («Illumina, Inc.», США) и мономолекулярного нанопорового секвенирования («Oxford Nanopore», Великобритания). Для приготовления библиотеки геномной ДНК применяли набор реактивов NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit («New England Biolabs», США). В результате секвенирования этой библиотеки на Illumina HiSeq2500 с применением набора реактивов HiSeq Rapid Run v2 sequencing reagents было получено 2735262 прочтений длиной 250 н. (всего 683,8 млн н.). Последовательности праймеров и участки с низким качеством прочтения (<q30) удаляли соответственно с использованием программ Cutadapt v. 1.17 (17) и Sickle v. 1.33 (https://github.com/najoshi/sickle). Дополнительно геномную ДНК секвенировали с помощью системы MinION («Oxford Nanopore», Великобритания). Секвенирование на MinION проводили, следуя протоколу Ligation Sequencing kit 1D, с использованием ячеек FLO-MIN106. В результате секвенирования получили 31234 чтений со средней длиной 16540 н. (всего 516,6 млн н.), которые были откорректированы программой Canu v. 1.6 (параметр –correct) (18). Затем осуществляли гибридную сборку отфильтрованных чтений Illumina и откорректированных чтений, полученных на MinION, в программе SPAdes v. 3.11.1 (19). Дополнительно полученные контиги еще раз объединяли с использованием полученных на MinION исходных прочтений в программе npScarf (20). Пробелы между контигами заполняли консенсусными последовательностями из чтений Illumina из графа SPAdes (параметр —spadesDir у npScarf). Поиск генов и их аннотацию проводили с помощью сервера RAST (http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi) с последующим сравнением последовательностей предсказанных белков с базами данных NCBI. Для поиска и классификации генов токсинов Cry применяли программу CryProcessor (https://lab7.arriam.ru/tools/cry_processor/), для выявления других инсектицидных токсинов *Bt* использовали программу BtToxin_scanner (http://bcam.hzau.edu.cn/BtToxin_scanner/index.php).

Полевые испытания эффективности биопрепарата на основе штамма *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* 56 (BtH_{10} 56) против колорадского жука проводили на картофеле (*Solanum tuberosum* L.) сортов Винета в 2018 и Рокко в 2019 году (ООО «МТС-Агро», Воронежская обл.) на площади 1 га. Для оценки энтомоцидной активности использовали жидкую форму препарата на основе штамма, полученного на дрожже-полисахаридной среде в ферментерах объемом 100 л (филиал ФГБНУ ВНИИСХМ «Экос», титр спор 2,12-2,3×10^9 КОЕ/мл). Качество препарата оценивали по стандартным методикам (21). Норма применения препарата — 20 л/га.

Посадки картофеля обрабатывали с помощью опрыскивателя ОПГ-2000 (ООО «Заря», Россия) (ширина захвата — 20 м). В качестве химического эталона использовали инсектицидные препараты Цепеллин, КЭ в 2018 году и Колорадо, ВРК (ООО «Агро Эксперт Груп», Россия) в 2019 году в дозах соответственно 100 г/л и 0,1 л/га. Учеты численности вредителя проводили непосредственно перед обработкой и после нее на 5-е и 10-е сут (в 2018 и 2019 годах), а также на 14-е сут (только в 2018 году). Для учета отбирали по 5 кустов картофеля, примыкающих друг к другу, по диагонали в 20 точках (всего по 100 кустов). Биологическую эффективность препарата определяли по формуле Abbott на основе учета снижения численности вредителя (22).

Результаты. По итогам секвенирования генома штамма BtH_{10} 56 с помощью двух технологий (Illumina и мономолекулярного нанопорового секвенирования) была определена его последовательность суммарной длиной 6290617 п.н., представленная 7 контигами (табл. 1). Хромосома и две плазмиды были собраны в виде кольцевых контигов, еще 4 контига, представляющие плазмиды, получили в линейной форме, что может быть связано с наличием в них протяженных повторов.

При анализе генома *B. thuringiensis* BtH_{10} 56 мы обнаружили 13 копий оперона генов рРНК (16S—23S—5S) и 107 генов транспортных РНК (тРНК), кодирующих все 20 аминокислот. По результатам аннотации были предсказаны 6611 потенциальных белок-кодирующих генов, из них у 4517 (68 %) функции были предсказаны в результате сравнения с базами данных NCBI. Локусы CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) в геноме *B. thuringiensis* BtH_{10} 56 отсутствовали.

1. Результаты сборки и аннотации генома *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* 56 (BtH_{10} 56)

Контиг	Форма	Длина, п.н.	Белок-кодирующие гены	Гены тРНК	Гены рРНК
1	Кольцевой	5553288	5755	107	39
2	Кольцевой	349728	445	–	–
3	Линейный	155294	173	–	–
4	Кольцевой	140546	140	–	–
5	Линейный	57038	68	–	–
6	Линейный	24713	21	–	–
7	Линейный	10010	9	–	–
Всего		6290617	6611	107	39

Примечание. Прочерки означают, что в контигах не было соответствующих генов.

В геноме штамма *B. thuringiensis* BtH_{10} 56 присутствовали 6 кластеров генов *nrp*, кодирующих нерибосомные пептид-синтетазы, обеспечивающие продукцию разнообразных пептидов, которые обладают антифунгальной и антимикробной активностью (23). Наличие этих последовательностей в геноме BtH_{10} 56 может объяснять его антифунгальные свойства.

В геноме BtH_{10} 56 был идентифицирован ген инсектицидного токсина, локализованный на одной из крупных плазмид (контиг 3). Анализ

аминокислотной последовательности соответствующего белка показал, что токсин относится к группе Cry1E, подтипу Cry1Ea7. Токсины Cry1E — это трехдоменные инсектицидные токсины *B. thuringiensis,* активные в отношении различных чешуекрылых (24, 25). Токсины Cry1Ea характерны для подвида *darmstadiensis* и, по данным литературы, активны против личинок чешуекрылых *Conopomorpha cramerella*, *Manduca sexta*, *Spodoptera littoralis*, *Bombyx mori*, *Lambdina fiscellaria*, *Malacosoma disstria*, *Cacyreus marshalli*, *Anticarsia gemmatalis*, *Choristoneura fumiferana* (12, 13, 26, 27), что позволяет рассматривать штамм BtH_{10} 56 как потенциально перспективный в отношении этих насекомых-вредителей.

Для некоторых подвидов *Bt* характерно наличие цитотоксических белков Cyt и вегетативных токсинов Vip (8). Однако генов *Cyt* и *Vip* в геноме исследуемого штамма мы не обнаружили. Инсектицидная активность штамма BtH_{10} 56, выявленная ранее в лабораторных испытаниях в отношении личинок листогрызущих насекомых (14), по-видимому, обусловлена продукцией токсина Cry1Ea.

Поскольку эффективность штамма в лабораторных условиях может существенно отличаться от его действия на природную популяцию насекомых-вредителей, следующим этапом исследования стали полевые испытания инсектицидной активности препарата на основе штамма BtH_{10} 56.

2. Эффективность жидкой формы препарата на основе штамма *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* 56 (BtH_{10} 56) против колорадского жука на картофеле сорта Винета (Воронежская обл., 2018 год)

Вариант	Численность вредителя				Эффективность, %		
	до обработки	после обработки, сут			после обработки, сут		
		5-е	10-е	14-е	5-е	10-е	14-е
BtH_{10} 56	426	193	52	16	54,7	87,8	96,2
Цепеллин (эталон)	181	104	27	0	42,5	85,0	100,0
Контроль (без обработки)	229	254	298	288			

Примечание. На 10-е и 14-е сут — после 2-кратной обработки.

3. Эффективность жидкой формы препарата на основе штамма *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* 56 (BtH_{10} 56) против колорадского жука на картофеле сорта Рокко (Воронежская обл., 2019год)

Вариант	Численность вредителя			Эффективность, %	
	до обработки	после обработки, сут		после обработки, сут	
		5-е	10-е	5-е	10-е
BtH_{10} 56	285	145	46	49,1	83,8
Колорадо (эталон)	171	28	18	83,6	89,5
Контроль (без обработки)	133	144	186		

Примечание. На 10-е и 14-е сут — после 2-кратной обработки.

В 2018 году учеты, проведенные на посадках картофеля сорта Винета перед обработкой, показали, что заселенность колорадским жуком составляла 30-40 % на расстоянии 100 м^2 от края поля. На остальной площади отмечали его незначительное очаговое распространение. Популяция вредителя состояла из личинок I (58,5 %), II (28,7 %) и III (12,8 %) возраста. Сразу после учета проводили обработку посадок картофеля препаратами. На 5-е сут после обработки эффективность биологического препарата BtH_{10} 56 составляла 54,7 % и была несколько выше, чем у химического эталона Цепеллина (42,5 %). В связи с установившейся жаркой и сухой погодой (температура воздуха 37 °С) провели повторную обработку посадок картофеля. На 10-е сут после первой обработки (5-е сут после второй) эффективность составляла 87,8 % и была сопоставима с таковой у

химического эталона. На 14-е сут эффективность препарата BtH_{10} 56 достигала 96,2 % (табл. 2).

В 2019 году химическим эталоном служил инсектицид Колорадо. На 5-е сут после обработки картофеля сорта Рокко эффективность биологического препарата составляла 49,1 % и была ниже, чем у химического эталона. В условиях жаркой погоды (температура воздуха 38-40 °С) отмечали интенсивное развитие вредителя, в связи с чем обработку препаратом BtH_{10} 56 и химическим эталоном повторили. Эффективность биологического препарата на 10-е сут после первой обработки составляла 83,8 %, химического эталона — 89,5 % (табл. 3).

В целом испытания биологического препарата на основе штамма BtH_{10} 56, проведенные в Воронежской области в 2018-2019 годах, показали его высокую эффективность против колорадского жука — 83,8-87,8 % на 10-е сут после обработки на двух разных сортах картофеля. Эти данные о биологической эффективности препарата в полевых условиях согласуются с результатами, полученными ранее в лабораторных исследованиях (14). Однако эффекты препаратов на основе Bt не ограничиваются только ролью инсектицида. Есть основания полагать, что значимым оказывается ростостимулирующий эффект, обусловленный продукцией сидерофоров, индол-3-уксусной кислоты, 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-деаминазы, ферментов, растворяющих минеральный фосфат (28-30). Полифункциональные свойства штамма BtH_{10} 56, показанные нами ранее (14, 15), позволяют считать исследуемый препарата перспективным агентом защиты растений ввиду его безопасности для нецелевой биоты, ростостимулирующего действия и антифунгальной активности. Антифунгальное действие ряда штаммов Bt связано с продукцией коротких пептидов Nrp (non-ribosomally synthetized peptides), образуемых специальными синтетазами в обход трансляционного аппарата (31). Шесть кластеров таких генов были выявлены и в геноме BtH_{10} 56.

Полученные в полевых испытаниях данные об инсектицидной активности штамма согласуются с результатами секвенирования и аннотации генома BtH_{10} 56, которые указывают на наличие в нем гена, кодирующего токсин Cry1Ea7. По данным литературы, этот тип токсина активен в отношении представителей отряда *Lepidoptera* (12, 13, 26, 27). В то же время один и тот же токсин Cry может быть эффективен в отношении нескольких отрядов насекомых, что выявляется только экспериментально, и такое определение границ действия штамма крайне трудоемко (32). Также нельзя исключать возможного влияния других факторов вирулентности на разнообразие насекомых-вредителей, поражаемых бактериями Bt (8). В частности, этот штамм продуцирует термостабильный экзотоксин (14), однако генов, обеспечивающих биосинтез экзотоксина I класса, в геноме BtH_{10} 56 мы не обнаружили. То есть штамм, вероятно, продуцирует экзотоксин II класса, генетический контроль синтеза которого пока не расшифрован, однако для этого токсина ранее была показана активность в отношении представителей отряда *Coleoptera* (33). Вероятно, синергическое действие указанного экзотоксина вместе с Cry1Ea7 обусловливает сильный токсический эффект в отношении личинок *L. decemlineata*, показанный в полевых и лабораторных условиях.

На российском рынке в настоящее время не представлены препараты на основе *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis*, однако в Беларуси разработан и успешно применяется препарат Бацитурин (Институт микро-

биологии НАН РБ, Беларусь), его действующее вещество — спорово-кристаллический комплекс и термостабильный β-экзотоксин бактерий *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis*. Бацитурин в полевых опытах показывал сходную с разработанным нами препаратом эффективность в отношении колорадского жука — 85-94 % (34). Помимо инсектицидов на основе var. *darmstadiensis*, действием в отношении колорадского жука обладают препараты на основе штаммов var. *thuringiensis*, например зарегистрированный в Российской Федерации Битоксибациллин® (ООО ПО «Сиббиофарм», г. Бердск) (6). Многие из известных штаммов var. *thuringiensis* и var. *darmstadiensis* продуцируют как эндотоксин, как и β-экзотоксин, и у препаратов на основе этих подвидов отмечается сходная инсектицидная активность (35). За рубежом для борьбы с колорадским жуком применяют препараты на основе штаммов *B. thuringiensis* var. *aizawai* и var. *tenebrionis*, однако действующими компонентами этих препаратов являются только инсектицидные эндотоксины Cry1Ia и Cry3Aa (4, 36).

Таким образом, инсектицидная активность штамма *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* 56 (BtH_{10} 56) обусловлена наличием гена, кодирующего токсин Cry1Ea7, и экзотоксина, относящегося, вероятно, ко II классу. Гены, кодирующие белковые токсины групп Cyt, Vip и Sip, а также экзотоксин I класса, у этого штамма отсутствуют. В то же время наличие у него генов, кодирующих ряд синтетаз нерибосомно синтезируемых пептидов Nrp, обусловливает его антифунгальные свойства. По результатам двухлетних полевых испытаний установлена высокая энтомоцидная активность жидкой формы препарата на основе изученного штамма в производственных условиях (Воронежская обл.), соответствующая химическим эталонам. Полученные нами данные указывают на перспективность применения биологического препарата на основе BtH_{10} 56 в системах интегрированной защиты растений и в органическом земледелии.

[1]ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: m.belousova@arriam.ru ✉, svetagrishechkina@mail.ru, ermolovavalya1940@mail.ru, k.antonets@arriam.ru, a.nizhnicov@arriam.ru;
[2]Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН,
119071 Россия, г. Москва, Ленинский пр., 33, стр. 2,
e-mail: mardanov@biengi.ac.ru, rakitin@biengi.ac.ru, mortu@yandex.ru, nravin@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 9 сентября 2019 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2020, V. 55, № 1, pp. 87-96

WHOLE GENOME SEQUENCING OF *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* 56 STRAIN AND THE STUDY OF INSECTICIDAL ACTIVITY OF THE BIOLOGICAL PREPARATION ON ITS BASIS

M.E. Belousova[1], S.D. Grishechkina[1], V.P. Ermolova[1], K.S. Antonets[1], A.V. Mardanov[2], A.L. Rakitin[2], A.V. Beletsky[2], N.V. Ravin[2], A.A. Nizhnikov[1]

[1]All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail m.belousova@arriam.ru (✉ corresponding author), svetagrishechkina@mail.ru, ermolovavalya1940@mail.ru, k.antonets@arriam.ru, a.nizhnicov@arriam.ru;
[2]Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology RAS, 33/2, Leninskii prosp., Moscow, 119071 Russia, e-mail mardanov@biengi.ac.ru, rakitin@biengi.ac.ru, mortu@yandex.ru, nravin@biengi.ac.ru
ORCID:
Belousova M.V. orcid.org/0000-0002-2886-026X
Grishechkina S.D. orcid.org/0000-0002-4877-705X
Ermolova V.P. orcid.org/0000-0002-9473-8334
Rakitin A.L. orcid.org/0000-0002-9178-6912
Beletsky A.V. orcid.org/0000-0002-7611-2354
Ravin N.V. orcid.org/0000-0002-1456-1832

Antonets K.S. orcid.org/0000-0002-8575-2601 Nizhnikov A.A. orcid.org/0000-0002-8338-3494
Mardanov A.V. orcid.org/0000-0002-8245-8757
The authors declare no conflict of interests
Acknowledgements:
Whole genome sequencing was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation. Annotation of toxins and virulence factors was financially supported by the Russian Science Foundation, grant No. 18-76-00028.
Received September 9, 2019 doi: 10.15389/agrobiology.2020.1.87eng

Abstract

Multifunctional microbiological preparations are promising for use in plant protection due to their diverse effects including growth-promoting effect and complex antifungal and insecticidal activity. One of the key microorganisms used as the basis of biological preparations production is the gram-positive spore-forming bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt). The high specificity of the action and the environmental safety of Bt-based preparations contribute to maintain biocenosis balance and to reduce the number of treatments as well as to obtain environmentally friendly products. Previously, *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* 56 (BtH_{10} 56) strain was isolated and selected at the All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology. It possesses insecticidal effect for the larval stages of leaf-eating insect pests, growth-promoting activity for potatoes and antifungal effect against various phytopathogenic fungi. This paper presents the first data on sequencing and annotation of the whole genome of the BtH_{10} 56 industrial strain; the factors responsible for the insecticidal and antifungal activity of this strain are identified, and the high efficiency of the biological preparation based on this strain is demonstrated under the field conditions against the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say.). The goal of the work was to identify the molecular determinants of the insecticidal properties of the industrial strain *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* 56 as well as to test its activity in the field. Field trials of the effectiveness of the biological preparation based on *Bt*H_{10} 56 against the Colorado potato beetle was carried out on potatoes (*Solanum tuberosum* L.) of the Vineta and Rocco varieties in 2018 and 2019 (MTS-Agro LLC, Voronezh Province) in the area of 1 ha. To evaluate the entomocidal activity, we used a liquid form of the preparation based on the strain produced by the Ekos branch of ARRIAM (the spore titer was $2.12\text{-}2.3\times10^9$ CFU/ml) in yeast-polysaccharide medium in a 100 l bioreactor. The application rate of the preparation was 20 l/ha. The potato plantings were treated using an OPG-2000 sprayer (Zarya LLC, Russia). As a chemical standard, the insecticidal preparations Cepellin, EC and Colorado, SC (Agro Expert Group LLC, Russia) at 100 g/l and 0.1 l/ha doses, respectively, were used as the chemical standards. The counts were carried out in 5, 10 and 14 days after treatment. The biological effectiveness of the preparation was determined by analyzing a decrease in the number of pests according to the Abbott formula. According to the test results, the high efficiency of the developed preparation against the Colorado potato beetle was established. This efficiency varied from 83.8 to 87.8 % and did not differ from the chemical standards. Using Illumina and Oxford Nanopore technology, we obtained the whole genome sequence of the BtH_{10} 56 strain. After assembly and annotation of the genome, a search for toxins was conducted. The CryProcessor and BtToxin_scanner programs were used to search and classify genes encoding the Bt insecticidal toxins. As a result, a gene belonging to the *cry1E* group, *cry1Ea7*, was found. The toxins belonging to this group are characterized by activity against various *Lepidoptera* pests. It was found that the genome of the strain does not contain genes encoding Vip, Sip and Cyt. toxins, however, it harbors several genes encoding synthetases of non-ribosomally synthesized peptides (*nrp*) that may explain its multifunctional properties. Thus, considering the data obtained the liquid form of the biological preparation based on BtH_{10} 56, can be recommended for use in the industry and organic farming.

Keywords: *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis*, insecticidal activity, exotoxin, endotoxin, Oxford Nanopore, Illumina, Cry toxin, *Bt*, Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*.

REFERENCES

1. Arora N., Agrawal N., Yerramilli V., Bhatnagar R.K. Biology and applications of *Bacillus thuringiensis* in integrated pest management. In: *General concepts in integrated pest and disease management, vol. 1.* A. Ciancio, K.G. Mukerji (eds.). Springer, Berlin, 2010: 227-244 (doi: 10.1007/978-1-4020-6061-8_9).
2. Martin P.A.W., Travers R.S. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, 55(10): 2437-2442.
3. Bravo A., Likitvivatanavong S., Gill S.S., Soberyn M. *Bacillus thuringiensis:* A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 41(7): 423-31 (doi: 10.1016/j.ibmb.2011.02.006).
4. Cooping L.G. *The manual of biocontrol agents: A World Compendium.* British Crop Protection

Council, Alton, 2009.
5. Soberón M., Gill S.S., Bravo A. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cell. Mol. Life Sci.*, 2009, 66(8): 1337-1349 (doi: 10.1007/s00018-008-8330-9).
6. *Gosudarstvennyi katalog pestitsidov i agrokhimikatov, razreshennykh k primeneniyu na territorii Rossiiskoi Federatsii* [The State Catalog of pesticides and agrochemicals approved for use on the territory of the Russian Federation]. Moscow, 2018 (in Russ.).
7. Kandybin N.V., Patyka T.I. Ermolova V.I., Patyka V.F. *Mikrobiokontrol' chislennosti nasekomykh i ego dominanta Bacillus thuringiensis* [Microbiocontrol of pest insects and its dominant, *Bacillus thuringiensis*]. St. Petersburg—Pushkin, 2009 (in Russ.).
8. Malovichko Y.V., Nizhnikov A.A., Antonets K.S. Repertoire of the *Bacillus thuringiensis* virulence factors unrelated to major classes of protein toxins and its role in specificity of host-pathogen interactions. *Toxins*, 2019, 11(6): 347 (doi: 10.3390/toxins11060347).
9. Kandybin N.V. V sbornike: *Sel'skokhozyaistvennaya mikrobiologiya v XIX-XXI vekakh* [In: Agricultural microbiology in the 19th-21st centuries]. St. Petersburg, 2001: 91-92 (in Russ.).
10. Kandybin N.V., Tikhonovich I.A. V sbornike: *Sovremennye sistemy zashchity i novye napravleniya v povyshenii ustoichivosti kartofelya k koloradskomu zhuku* [In: Modern protection systems and new directions in increasing the resistance of potatoes to the Colorado potato beetle]. Moscow, 2000: 50-54 (in Russ.).
11. Krieg A., de Barjac H., Bonnefoi A. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* isolated in Germany: *Bacillus thuringiensis* var. darmstadiensis. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1968, 10(2): 428-430 (doi: 10.1016/0022-2011(68)90104-3).
12. van Frankenhuyzen K., Gringorten J.L., Gauthier D., Milne R.E., Masson L., Peferoen M. Toxicity of activated Cryl proteins from *Bacillus thuringiensis* to six forest lepidoptera and *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1993, 62(3): 295-301 (doi: 10.1006/jipa.1993.1116).
13. Fiuza L.M., Knaak N., da Silva R.F.P., Henriques J.A.P. Receptors and lethal effect of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to the *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Noctuidae). *International Scholarly Research Notices Microbiology*, 2013, 2013: 940284 (doi: 10.1155/2013/940284).
14. Grishechkina S.D., Ermolova V.P., Romanova T.A., Nizhnikov A.A. Search for natural isolates of *Bacillus thuringiensis* for development of ecologically friendly biologicals. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [*Agricultural Biology*], 2018, 53(5): 1062-1069 (doi: 10.15389/agrobiology.2018.5.1062eng).
15. Tikhonovich I.A., Ermolova V.P., Grishechkina S.D., Romanova T.A., Nizhnikov A.A., Antonets K.S. *Shtamm Bacillus thuringiensis var. darmstadiensis 56 v kachestve polifunktsional'nogo sredstva dlya rastenievodstva. Patent 2692655 (RF), MPK C 12 N 1/00. FGBNU VNIISKHM (RF) № 2017143084. Zayavl. 11.12.2017. Opubl. 25.06.2019. Byul. № 18* [Strain *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* 56 as a multifunctional product for plant growing *Patent 2692655 (RF). MPK C 12 N 1/00. FGBNU VNIISKHM (RF) № 2017143084.* Appl. 11.12.2017. Publ. 25.06.2019. Bull. № 18] (in Russ.).
16. Cherkashin V.I. *Kartofel' i ovoshchi*, 2001, 3: 42-44 (in Russ.).
17. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Journal*, 2011, 17(1): 10-12 (doi: 10.14806/ej.17.1.200).
18. Koren S., Walenz B.P., Berlin K., Miller J.R., Bergman N.H., Phillippy A.M. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Research*, 2017, 27(5): 722-736 (doi: 10.1101/gr.215087.116).
19. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 2012, 19(5): 455-477 (doi: 10.1089/cmb.2012.0021).
20. Cao M.D., Nguyen S.H., Ganesamoorthy D., Elliott A.G., Cooper M.A., Coin L.J. Scaffolding and completing genome assemblies in real-time with nanopore sequencing. *Nature Communications*, 2017, 8: 14515 (doi: 10.1038/ncomms14515).
21. Ermolova V.P., Grishechkina S.D., Antonets K.S. *Vydelenie i identifikatsiya kul'tur Bacillus thuringiensis var. thuringiensis i var. darmstadiensis, a takzhe metodologiya otsenki ikh patogennykh svoistv, selektsii i khraneniya*: *Prakticheskoe rukovodstvo* /Pod redaktsiei A.A. Nizhnikova [Isolation and identification of cultures of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* and var. *darmstadiensis* and a methodology for evaluating their pathogenic properties, selection and storage: a practical guide. A.A. Nizhnikov (ed.)]. St. Petersburg, 2018 (in Russ.).
22. Abbott W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 1925, 18: 265-267.
23. Mongkolthanaruk W. Classification of *Bacillus* beneficial substances related to plants, humans and animals. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 22(12): 1597-1604 (doi: 10.4014/jmb.1204.04013).

24. Palma L., Mucoz D., Berry C., Murillo J., Caballer P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, 2014, 6(12): 3296-3325 (doi: 10.3390/toxins6123296).
25. Pardo-López L., Soberón M., Bravo A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(1): 3-22 (doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x).
26. Herrero S., Borja M., Ferré J. Extent of variation of the *Bacillus thuringiensis* toxin reservoir: the case of the geranium bronze, *Cacyreus marshalli* Butler (Lepidoptera: Lycaenidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 4090-4094 (doi: 10.1128/AEM.68.8.4090-4094.2002).
27. Santoso D., Chaidamsari T., Wiryadiputra S., de Maagd R.A. Activity of *Bacillus thuringiensis* toxins against cocoa pod borer larvae. *Pest Management Science*, 2004, 60(8): 735-738 (doi: 10.1002/ps.927).
28. Azizoglu U. *Bacillus thuringiensis* as a biofertilizer and biostimulator: a mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of *Bt*. *Current Microbiology*, 2019, 76(11): 1379-1385 (doi: 10.1007/s00284-019-01705-9).
29. Armada E., Probanza A., Roldán A., Azcón R. Native plant growth promoting bacteria *Bacillus thuringiensis* and mixed or individual mycorrhizal species improved drought tolerance and oxidative metabolism in *Lavandula dentata* plants. *Journal of Plant Physiology,* 2016, 192: 1-12 (doi: 10.1016/j.jplph.2015.11.007).
30. Raddadi N., Cherif A., Boudabous A., Daffonchio D. Screening of plant growth promoting traits of *Bacillus thuringiensis. Annals of Microbiology*, 2008, 58(1): 47-52 (doi: 10.1007/BF03179444).
31. Zhao X., Kuipers O.P. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of *Bacillales* species. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 882 (doi: 10.1186/s12864-016-3224-y).
32. van Frankenhuyzen K. Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2013, 114(1): 76-85 (doi: 10.1016/j.jip.2013.05.010).
33. Levinson B.L., Kasyan K.J., Chiu S.S., Currier T.C., González J.M. Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(6): 3172-3179 (doi: 10.1128/jb.172.6.3172-3179.1990).
34. Prishchepa L.I., Mikul'skaya N.I., Kanapatskaya V.A., Evstigneeva N.V., Kasperovich E.V., Bezruchenko N.N., Voitka D.V. *Biologicheskie sredstva zashchity sel'skokhozyaistvennykh kul'tur ot vreditelei i bolezni* [Biological protection of crops from pests and diseases]. Minsk, 2000 (in Russ.).
35. Dolzhenko T.V. *Agro XXI*, 2013, 7-9: 20-22 (in Russ.).
36. Wu S.-J., Dean D.H. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIIIA δ-endotoxin. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 255(4): 628-640 (doi: 10.1006/jmbi.1996.0052).