

Научная статья
УДК 579.26:579.6
EDN: AQLWEO
DOI: 10.21285/achb.941



Частота встречаемости cry-подобных генов в штаммах *Bacillus thuringiensis* Крымской коллекции микроорганизмов

А.В. Крыжко

Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма,
Симферополь, Российская Федерация

Аннотация. Энтомопатогенные штаммы *Bacillus thuringiensis* используются для разработки биопрепаратов нового поколения против листогрызущих вредителей. Целью проведенного исследования было изучение частоты встречаемости cry-подобных генов в штаммах и выбор перспективного для создания на его основе энтомопатогенного биопрепарата. Материалом для исследования послужили энтомопатогенные штаммы *Bacillus thuringiensis*, полученные из Крымской коллекции микроорганизмов Научно-исследовательского института сельского хозяйства Крыма. Энтомопатогенное действие перспективных штаммов изучали в ходе лабораторных опытов на личинках представителей отрядов Coleoptera, Lepidoptera. В качестве наиболее перспективных, содержащих не менее четырех генов токсинообразования, отобраны штаммы *Bacillus thuringiensis* 708 (cry1, thuE, cry7-8, cry11), 942 (cry1, thuE, cry11, vip), 949 (cry1, thuE, cry4, cry7-8), 989 (cry1, thuE, cry11, vip), 0162 (cry1, thuE, cry11, vip), 0307 (cry1, thuE, cry4, cry7-8), 0308 (cry1, thuE, cry4, cry7-8), 0363 (cry1, thuE, cry5, cry11) и 0371 (cry1, thuE, cry9, cry11). Установлено, что выделенные штаммы *Bacillus thuringiensis* 0162, 0307, 0363 и 0371 оказывают высокое энтомопатогенное действие против личинок колорадского жука, ильмового листоеда (88,3–100%), гусениц плодовой моли, капустной совки, златогузки и американской бабочки (92,3–100%). Показано, что штамм *Bacillus thuringiensis* 0371 проходит все классические фазы развития и в течение 45–48 ч демонстрирует полный выход кристаллов и спор из спорангия. Таким образом, штамм 0371 перспективен для разработки регламента производства биопрепарата для защиты сельскохозяйственных растений.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, cry-подобные гены, листогрызущие вредители, Coleoptera, Lepidoptera

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № FNZW-2022-0006.

Для цитирования: Крыжко А.В. Частота встречаемости cry-подобных генов в штаммах *Bacillus thuringiensis* Крымской коллекции микроорганизмов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 4. С. 567–577. DOI: 10.21285/achb.941. EDN: AQLWEO.

PHYSICO-CHEMICAL BIOLOGY

Original article

Frequency of cry-like genes in *Bacillus thuringiensis* strains of the Crimean microorganism collection

Anastasiia V. Kryzhko

Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol, Russian Federation

Abstract. The entomopathogenic strains of *Bacillus thuringiensis* are used in the development of new-generation biopreparations against leaf-eating insects. The present study was aimed at analyzing the frequency of cry-like genes in the strains and at identifying a promising strain for the development of an entomopathogenic biopreparation on its basis. The study materials included the entomopathogenic strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from the Crimean microorganism collection of the Crimean Agricultural Research Institute. The entomopathogenic effect

of promising strains was studied in laboratory experiments on Coleoptera and Lepidoptera larvae. The following strains of *Bacillus thuringiensis* were identified as the most promising, i.e., containing at least four toxin genes: 708 (*cry1*, *thuE*, *cry7-8*, *cry11*), 942 (*cry1*, *thuE*, *cry11*, *vip*), 949 (*cry1*, *thuE*, *cry4*, *cry7-8*), 989 (*cry1*, *thuE*, *cry11*, *vip*), 0162 (*cry1*, *thuE*, *cry11*, *vip*), 0307 (*cry1*, *thuE*, *cry4*, *cry7-8*), 0308 (*cry1*, *thuE*, *cry4*, *cry7-8*), 0363 (*cry1*, *thuE*, *cry5*, *cry11*) и 0371 (*cry1*, *thuE*, *cry9*, *cry11*). The isolated strains of *Bacillus thuringiensis* 0162, 0307, 0363, and 0371 were found to have a high entomopathogenic effect on the larvae of the Colorado potato beetle and elm-leaf beetle (88.3–100%), as well as the caterpillars of ermine moth, cabbage moth, brown-tail moth, and fall webworm (92.3–100%). It is shown that *Bacillus thuringiensis* strain 0371 goes through all traditional stages of development and exhibits complete release of crystals and spores from the sporangium within 45–48 h. Thus, strain 0371 can be used to develop specifications for manufacturing a plant protection biopreparation.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, cry-like genes, leaf-eating insects, Coleoptera, Lepidoptera

Funding. The work was financially supported by the state assignment no. FNZW-2022-0006.

For citation: Kryzhko A.V. Frequency of cry-like genes in *Bacillus thuringiensis* strains of the Crimean microorganism collection. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(4):567-577. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.941. EDN: AQLWEO.

ВВЕДЕНИЕ

Вопрос получения новых перспективных биопрепаратов, эффективных против листогрызущих вредителей, не теряет своей актуальности. На рынке современных биопрепаратов доминируют препараты на основе энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis*. Промышленные препараты данного типа эффективны против более 400 видов насекомых из семейств Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera, Orthoptera [1, 2]. Основная часть биопрепаратов разрабатывается на основе *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (Битоксибациллин, Битоксин и др.) и применяется против комплекса листогрызущих насекомых на овощных, плодово-ягодных культурах, в садово-парковых насаждениях и в лесах [3].

Существуют несколько причин развития интереса к *B. thuringiensis*. Данная группа бактерий обладает специфическим действием на насекомых-вредителей, использование *B. thuringiensis* не вызывает стойкого загрязнения почвы, листьев и воздуха энтомопатогенными бактериями. Ко всему прочему, *B. thuringiensis* является естественным компонентом биоценозов, она безопасна для энтомофагов и не является патогенной для млекопитающих и человека [4]. Именно широким использованием *B. thuringiensis* в практике контроля вредителей, их селективным действием, безопасностью относительно компонентов агроценоза и здоровья человека обусловлена необходимость поиска и изучения новых штаммов [5]. Кроме того, штаммы с высокими энтомопатогенными и технологическими свойствами используются для разработки биопрепаратов нового поколения, а также в качестве аналогов уже существующих штаммов-продуцентов [6].

Действие *B. thuringiensis* на насекомых связано как с инфекционным процессом, так и с образованием токсических веществ. Некоторые из этих факторов вирулентности являются общими для представителей группы *B. cereus*, например цвиттермицин А, гемолизины, гемолитический комплекс и часть энтеротоксинов [7, 8]. Другие характерны исключительно для *B. thuringiensis* – это Cyt- и Cry-эндотоксины. *B. thuringiensis* представляет собой грамположительные спорообразующие бактерии, способные формировать при споруляции параспоральные кристаллические включения белковой природы, Cry- и Cyt-токсины, которые обуславливают главным образом их инсектицидную активность [9]. В период

вегетативного роста некоторые штаммы *B. thuringiensis* продуцируют инсектицидные белки (Vip- и Sip-токсины), которые секретируются в среду. Впервые Vip-токсины были обнаружены в середине 1990-х годов, на данный момент описано 176 Vip-токсинов, распределенных на 4 класса: Vip 1, Vip 2, Vip 3 и Vip 4 [10]. Обширные исследования *in vitro* и *in vivo* показали почти полное отсутствие перекрестной резистентности между Vip3A- и Cry1-белками [11]. Наличие Vip3-токсинов открывает возможность использования биопестицидов на основе *B. thuringiensis* в отношении большего числа вредителей, а также препятствует развитию устойчивости насекомых к Cry-белкам [12, 13].

Основное значение в энтомоцидном действии бактерий традиционно уделяется кристаллическим белковым параспоральным Cyt- и Cry-включениям, формируемым клетками бактерий во время фазы стационарного роста.

На сегодняшний день Комитет по номенклатуре токсинов *B. thuringiensis* [14] классифицировал 73 различных типа инсектицидных белков (от Cry1 до Cry74) и доказал токсичность данных белков против Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Diptera, нематод (как паразитов человека и животных, так и свободноживущих Rhabditida) некоторых улиток (Gastropoda) [15–18] и/или раковых клеток человека различного происхождения [19]. Таким образом, вопросы идентификации генов *B. thuringiensis*, ответственных за энтомоцидную активность и дифференциацию бактерий *B. thuringiensis* на основе физиолого-биохимических свойств, представляют определенный научно-практический интерес. Идентификация cry-генов, кодирующих Cry-белки штаммов Крымской коллекции микроорганизмов Научно-исследовательского института сельского хозяйства Крыма могла бы способствовать не только определению одного из ключевых факторов вирулентности, но и попытке систематизировать перспективные для создания биопрепарата против листогрызущих насекомых штаммы коллекции по спектру действия эндотоксинов [20].

Целью проведенных исследований являлось изучение частоты встречаемости cry-подобных генов в штаммах энтомоцидной бактерии *B. thuringiensis* Крымской коллекции микроорганизмов, а также выбор перспективного биоагента для создания на его основе энтомопатогенного биопрепарата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалом для исследования генов *B. thuringiensis*, ответственных за синтез инсектицидных кристаллических белков, послужили штаммы *B. thuringiensis*, зарегистрированные в Крымской коллекции микроорганизмов Научно-исследовательского института сельского хозяйства Крыма, зарегистрированной на сайте «Научно-технологическая инфраструктура Российской Федерации» под номером 507484¹. В качестве позитивного контроля использовали полученные из лаборатории протеомики надорганизменных систем Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии штаммы *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 41 (H₁) и *B. thuringiensis* var. *darmstadiensis* 109 (H₁₀), содержащие гены *thuE*, *cry1* и *cry11*, а в качестве позитивного контроля для генов *cry2*, *cry5* и *vip* использовали штамм 358 коллекции Института систематики и экологии животных СО РАН, за что автор статьи выражает благодарность авторам штаммов. Наличие соответствующих генов в геноме контрольных штаммов устанавливали путем поиска соответствующих нуклеотидных последовательностей при помощи алгоритма BLAST [21].

Выделение тотальной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из вегетативной массы клеток бактерий *B. thuringiensis* провели согласно общепринятым методам [22]. Качество выделенной ДНК проверяли с помощью анализа методом полимеразной цепной реакции с использованием стандартных бактериальных праймеров ITS-16S – 1392-S-15 (5' – GNACA-

CACCGCCCGT – 3') и ITS-23S-206-A-21 (5' – NCTTAGAT-GTTTCAGTTCVCY – 3' [23]. Детекцию гена энтомоцидной активности *cry1* в штаммах *B. thuringiensis* проводили при помощи пары праймеров *cry1*-543, упоминавшихся в работах А. Браво [24], нацеленных на одноименные гены, расположенные на плазмидной ДНК бактерии (табл. 1). Для детекции генов энтомоцидных белков классов Cry2, Cry3, Cry4, Cry5, Cry7-8, Cry9, Cry11, Vip, *thuE* пользовались праймерами Un2, Un3, Un4, Un5, Un7-8, Un9, Un11, Vip и BE [5, 25]. Объем реакционной смеси составил 25 мкл и включал: 5 мкл Screen Mix-HS («Евроген»), содержащей 3 mM MgCl₂ и 0,12 mM dNTPs; а также 50 нг бактериальной ДНК, 0,2 мкл каждого праймера (5 pM/мкл). ПЦР проводили с использованием следующей программы: 1 мин начальная денатурация при 95 °С, затем 35 циклов – 30 с, денатурация при 94 °С, 30 с отжиг при целевой температуре отжига и 1 мин элонгация при 72 °С, и заключительная элонгация 1 мин при 72 °С. ПЦР продукты визуализировали с помощью электрофореза в 1,5%-м агарозном геле [26].

Энтомопатогенное действие перспективных штаммов изучали в лабораторных опытах на личинках колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*, Coleoptera) и ильмового листоода (*Xanthogaleruca luteola* (Stål) Müller, Coleoptera), гусеницах капустной совки (*Mamestra brassicae*, Lepidoptera), плодовой моли, златогузки и американской белой бабочки (*Hyphantria cunea* Dryer, Lepidoptera). Лабораторные опыты по изучению энтомоцидной активности штаммов *B. thuringiensis* проводили в литровых стаканах, куда помещали

Таблица 1. Характеристика праймеров, используемых в исследованиях по идентификации генов энтомоцидной активности в геноме штаммов *Bacillus thuringiensis*

Table 1. Characteristics of primers used in studies of insecticidal activity genes identification in the genome of *Bacillus thuringiensis* strains

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера (5'→3')	Длина ампликона, bp	Температура отжига, °С
Un1F	CATGATTCATGCGGCAGATAA AC	200	57
Un1R	TTGTGACACTTCTGCTCCCAT		
Un2F	GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG	689–701	57
Un2R	CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT		
Un3F	CGTTATCGCAGAGAGATGACATTAAC	589–604	54
Un3R	GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC		
Un4F	GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC	439	60
Un4R	GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC		
Un5F	TTACGTAATTTGGTCAATCAAGCAAA	474–489	54
Un5R	AAGACCAAATTCATACCAAGGGTT		
Un7-8F	AAGCAGTGAATGCCTTGTTTAC	420	48
Un7-8R	CTTCTAAACCTTGACTACTT		
Un9F	CGGTGTTACTATTAGCGAGGGCGG	351–359	60
Un9R	GTTTGAGCCGCTTCACAGCAATCC		
Un11F	TTCCAACCCAACTTTCAAGC	305	54
Un11R	AGCTATGGCCTAAGGGGAAA		
VipF	ССТСТАТГТТГАГТГАТГА	1000	50
VipR	СТАТАСТСГГТТСАСТТГА		
BEF	AAAGGGTCTGGTAAAACA	406	54
BER	ACCATCGACTTCTTCTT		

¹ Крымская коллекция микроорганизмов // Научно-технологическая инфраструктура Российской Федерации. Режим доступа: <http://срп-рф.ру/усу/507484/> (дата обращения: 16.04.2024).

личинки или гусеницы 1-2 возраста и листья кормового растения, обработанные жидкой культурой штаммов при титре спор 200 млн/мл. Обработанным кормом личинки питались 3 суток, после чего его меняли на необработанный. Жидкие споровые культуры получали при культивировании бактерий на технологических качалках в дрожже-полисахаридной среде, в состав которой входили следующие компоненты, %: дрожжи кормовые – 3,0, мука кукурузная – 1,5. Культивирование осуществляли в колбах объемом 750 мл с 35 мл питательной среды. Опыты проводили в 3 повторностях по 25 личинок в каждой. В качестве эталона использовали жидкую споровую культуру штамма *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 98 (продуцент Битоксибациллина) и штамма *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 0293 (продуцент Лепидоцида).

Статистическую обработку полученных результатов провели с применением современных методов статистических исследований с применением Microsoft Excel и ППП Statistica 7 [27], Jupyter Notebook и языка программирования Python, прикладных библиотек numpy, matplotlib [28, 29].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гены токсинообразования определяли в 61 штамме *B. thuringiensis* коллекции энтомопатогенов отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБН «НИИСХ Крыма».

Детекцию генов энтомоцидной активности группы *cry*, *thuE* и *vip* в штаммах *B. thuringiensis* проводили с помощью классической ПЦР (табл. 2, рис. 1–5). В результате исследований с применением праймеров Un1 было установлено наличие генов класса *cry1* в геноме штаммов



Рис. 1. Гель-электрофорез продуктов полимеразной цепной реакции, полученных в результате амплификации дезоксирибонуклеиновой кислоты штаммов *Bacillus thuringiensis* с праймерами Un1 (M – маркер длин дезоксирибонуклеиновых кислот (50+ bp DNA Ladder, «Евроген»); в верхней строчке указаны номера исследуемых штаммов и названия праймеров)

Fig. 1. Gel electrophoresis of polymerase chain reaction products obtained as a result of deoxyribonucleic acid amplification of *Bacillus thuringiensis* strains with Un1 primers (M – 50+ bp DNA Ladder, “Eurogen”; the top line shows the numbers of the studied strains and the names of the primers)

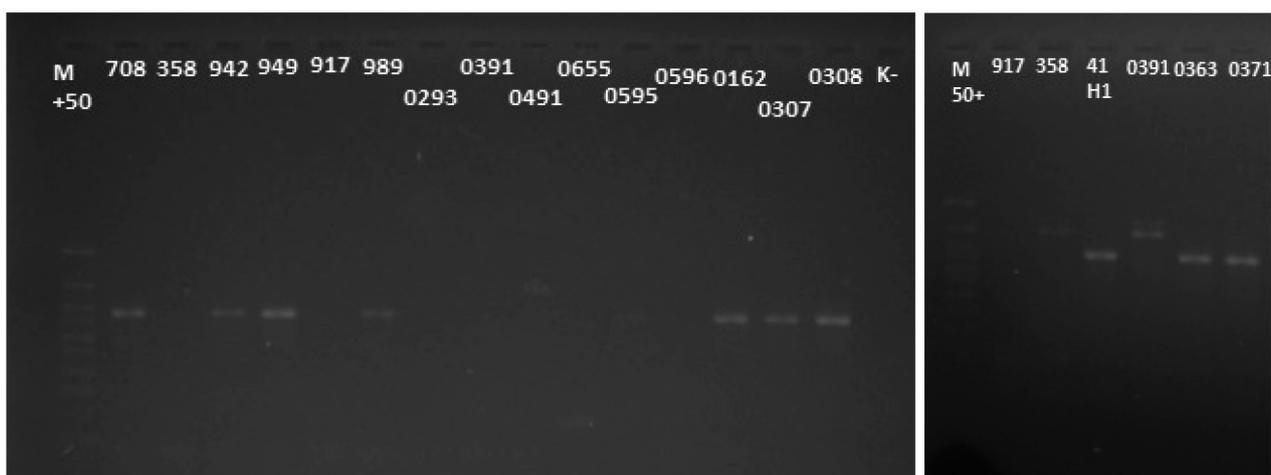


Рис. 2. Гель-электрофорез продуктов полимеразной цепной реакции, полученных в результате амплификации дезоксирибонуклеиновой кислоты штаммов *Bacillus thuringiensis* с праймерами BE (M – маркер длин дезоксирибонуклеиновых кислот (50+ bp DNA Ladder, «Евроген»); в верхней строчке указаны номера исследуемых штаммов и названия праймеров)

Fig. 2. Gel electrophoresis of polymerase chain reaction products obtained as a result of deoxyribonucleic acid amplification of *Bacillus thuringiensis* strains with BE primers (M – 50+ bp DNA Ladder, “Eurogen”; the top line shows the numbers of the studied strains and the names of the primers)

Таблица 2. Наличие энтомоцидных и cry-подобных генов в штаммах *Bacillus thuringiensis*

Table 2. Presence of entomocidal and cry-like genes in strains of *Bacillus thuringiensis*

Штамм	Гены энтомоцидных белков <i>Bacillus thuringiensis</i>									β-экзотоксин	Серотип
	<i>cry1</i>	<i>thuE</i>	<i>cry2</i>	<i>cry4</i>	<i>cry5</i>	<i>cry7-8</i>	<i>cry9</i>	<i>cry11</i>	<i>vip</i>		
98	0	1	0	0	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
202	0	1	0	0	0	0	0	1	0	+	thuringiensis
685	0	1	0	0	0	0	0	1	0	+	thuringiensis
708	1	1	0	0	0	1	0	1	0	+	thuringiensis
787	1	1	0	0	0	0	0	1	0	-	H/o
792	1	1	0	0	0	1	0	0	0	+	thuringiensis
800	1	1	0	0	0	1	0	0	0	+	thuringiensis
810	0	1	0	0	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
815	0	1	0	0	0	1	0	0	0	+	thuringiensis
820	1	1	0	0	0	1	0	0	0	+	darmstadiensis
836	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-	dendrolimus
854	1	1	0	0	0	1	0	0	0	+	thuringiensis
888	1	1	0	0	0	1	0	0	0	+	thuringiensis
902	0	1	0	0	0	0	0	1	0	+	thuringiensis
917	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-	kurstaki
926	1	1	0	1	0	1	0	0	0	-	kurstaki
942	1	1	0	0	0	0	0	1	1	-	dendrolimus
949	1	1	0	1	0	1	0	0	0	-	H/o
989	1	1	0	0	0	0	0	1	1	+	thuringiensis
994	1	1	0	0	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
10/H	0	1	0	1	0	0	0	1	0	-	dendrolimus
39/H	0	1	0	1	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
42/H	0	1	0	1	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
014	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-	H/o
048	0	1	0	1	0	0	0	0	0	-	H/o
072	1	1	0	1	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
0105	1	1	0	1	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
0120	0	1	0	1	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
0161	0	1	0	0	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
0162	1	1	0	0	0	0	0	1	1	+	thuringiensis
0164	1	1	0	1	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
0177	0	1	0	1	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
0198	0	1	0	0	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
0271	1	1	0	0	0	0	0	0	0	+	darmstadiensis
0279	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	darmstadiensis
0293	1	0	0	1	0	0	0	0	0	+	kurstaki
0304	0	1	0	1	0	1	0	0	0	+	thuringiensis
0307	1	1	0	1	0	1	0	0	0	+	thuringiensis
0308	1	1	0	1	0	1	0	0	0	+	kurstaki
0326	1	1	0	1	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
0332	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	thuringiensis
0337	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	thuringiensis
0352	0	1	0	0	0	0	0	1	0	+	thuringiensis
0361	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	thuringiensis
0363	1	1	0	0	1	0	0	1	0	+	thuringiensis
0371	1	1	0	0	0	0	1	1	0	+	thuringiensis
0374	1	1	0	0	0	1	0	0	0	+	thuringiensis
0376	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	thuringiensis
0379	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	kurstaki
0399	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	H/o
0391	0	0	0	0	0	0	0	1	0	+	kurstaki
0409	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	H/o
0411	1	1	0	0	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
ЛП	1	1	0	0	1	0	0	0	0	+	thuringiensis
109-C	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	morrizoni
Z-52	1	1	0	1	0	0	0	1	0	+	kurstaki
358	1	0	1	0	1	0	0	1	1	-	kurstaki
4301	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	thuringiensis
202-16	0	1	0	0	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
41H1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	thuringiensis
109H10	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	darmstadiensis

Примечание. H/o – не обнаружен.

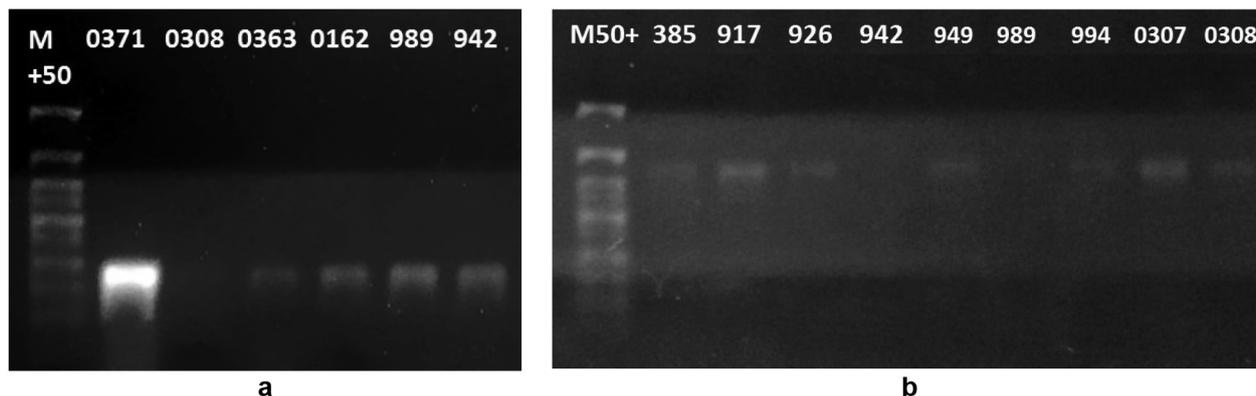


Рис. 3. Гель-электрофорез продуктов полимеразной цепной реакции, полученных в результате амплификации дезоксирибонуклеиновой кислоты штаммов *Bacillus thuringiensis*: а – с праймерами Un11; б – с праймерами Un4 (М – маркер длин дезоксирибонуклеиновых кислот (50+ bp DNA Ladder, «Евроген»); в верхней строчке указаны номера исследуемых штаммов и названия праймеров)

Fig. 3. Gel electrophoresis of polymerase chain reaction products obtained as a result of deoxyribonucleic acid amplification of *Bacillus thuringiensis* strains with: а – Un11 primers; б – Un4 primers (M – 50+ bp DNA Ladder, “Eurogen”; the top line shows the numbers of the studied strains and the names of the primers)

B. thuringiensis 708, 787, 792, 800, 820, 854, 888, 926, 942, 949, 989, 994, 072, 0105, 0162, 0164, 0271, 0279, 0293, 0307, 0308, 0326, 0332, 0337, 0361, 0363, 0371, 0374, 0376, 0379, 0399, 0409, 0411, ЛП, 109-С, Z-52, 358, 4301, 41Н1, 109Н10. При помощи пары праймеров *ThuE* было установлено наличие гена *thu* субъединицы *E* в геноме штаммов *B. thuringiensis* 98, 202, 685, 708, 787, 792, 800, 810, 815, 820, 836, 854, 888, 902, 926, 942, 949, 989, 994, 10/Н, 39/Н, 42/Н, 014, 048, 072, 0105, 0120, 0161, 0162, 0164, 0177, 0198, 0271, 0279, 0293, 0304, 0307, 0308, 0326, 0332, 0337, 0352, 0361, 0363, 0371, 0374, 0376, 0379, 0399, 0409, 0411, ЛП, 109-С, Z-52, 4301, 202-16, 41Н1, 109Н10.

Анализ коллекционных штаммов позволил установить, что ген класса *cry2* был детектирован только

в геноме штамма *B. thuringiensis* 358. Генов класса *cry3* в исследованных штаммах не обнаружено. Установлено наличие генов класса *cry4* в геномах штаммов *B. thuringiensis* 917, 926, 949, 10/Н, 39/Н, 42/Н, 048, 072, 0105, 0120, 0164, 0177, 0293, 0304, 0307, 0308, 0326, Z-52. Гены, кодирующие энтомоцидный кристаллический белок, принадлежащий к классу *cry5*, обнаружили в геномах штаммов *B. thuringiensis* 0363, ЛП, 358. Гены класса *cry7-8* детектированы в геномах штаммов *B. thuringiensis* 708, 792, 800, 815, 820, 854, 888, 926, 949, 0304, 0307, 0308, 0326, 0374. Установлено наличие гена класса *cry9* в геноме штамма *B. thuringiensis* 0371. Наиболее распространенными в штаммах *B. thuringiensis* Крымской коллекции оказались гены класса *cry11*. Они были отмечены в геномах

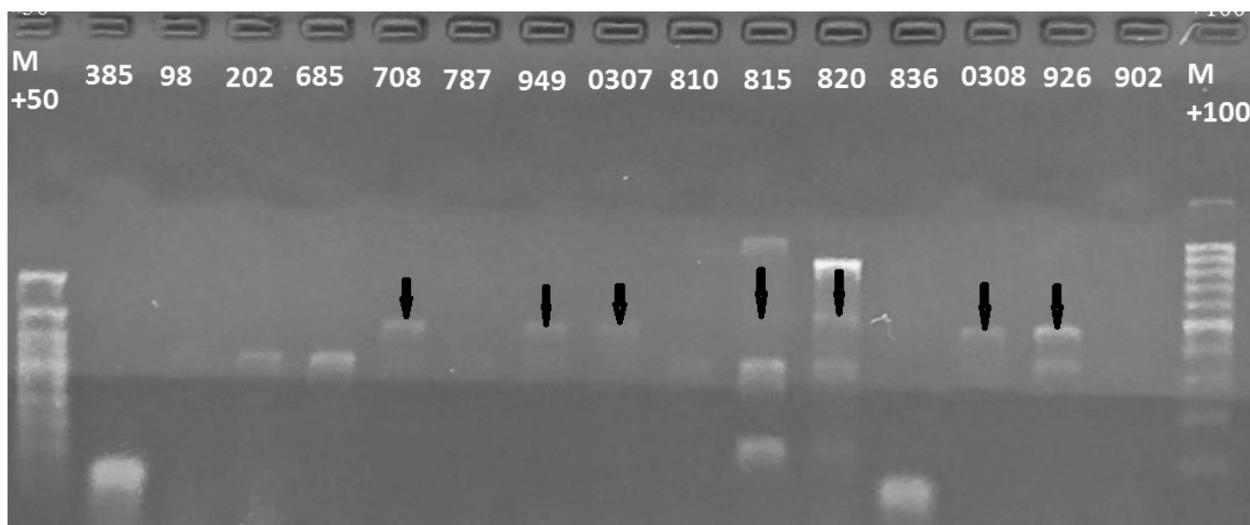


Рис. 4. Гель-электрофорез продуктов полимеразной цепной реакции, полученных в результате амплификации дезоксирибонуклеиновой кислоты штаммов *Bacillus thuringiensis* с праймерами Un7-8 (М – маркер длин дезоксирибонуклеиновых кислот (50+ bp DNA Ladder, «Евроген»); в верхней строчке указаны номера исследуемых штаммов и названия праймеров, стрелочками показаны целевые фрагменты)

Fig. 4. Gel electrophoresis of polymerase chain reaction products obtained as a result of deoxyribonucleic acid amplification of *Bacillus thuringiensis* strains with Un7-8 primers (M – 50+ bp DNA Ladder, “Eurogen”; the top line shows the numbers of the studied strains and the names of the primers, target fragments are shown with arrows)

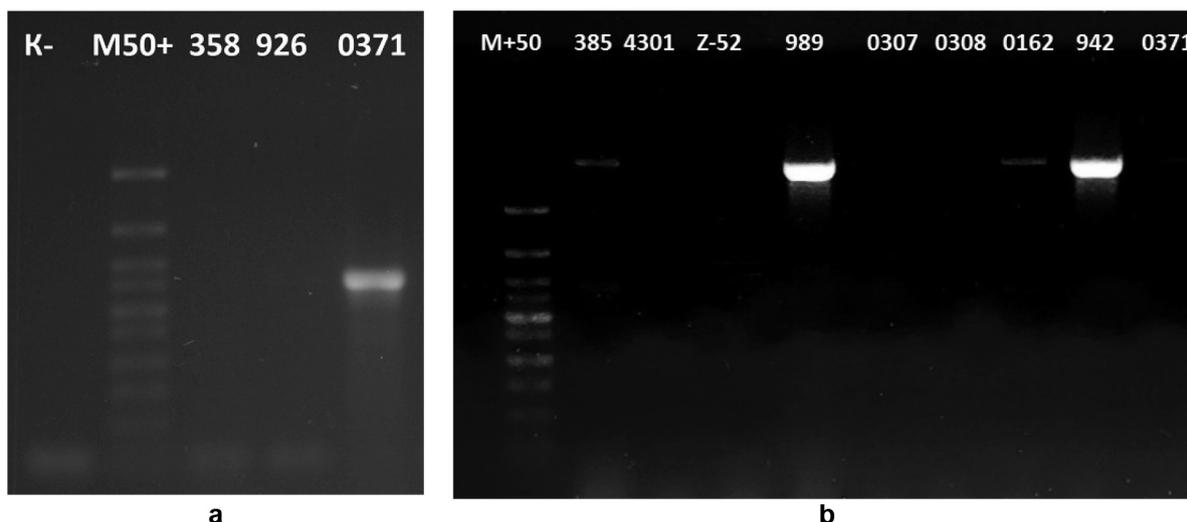


Рис. 5. Гель-электрофорез продуктов полимеразной цепной реакции, полученных в результате амплификации дезоксирибонуклеиновой кислоты штаммов *Bacillus thuringiensis*: а – с праймерами Un9; б – с праймерами Vip (М – маркер длин дезоксирибонуклеиновых кислот (50+ bp DNA Ladder, «Евроген»); в верхней строчке указаны номера исследуемых штаммов и названия праймеров)

Fig. 5. Gel electrophoresis of polymerase chain reaction products obtained as a result of deoxyribonucleic acid amplification of *Bacillus thuringiensis* strains with: а – Un9 primers; б – Vip primers (M – 50+ bp DNA Ladder, “Eurogen”; the top line shows the numbers of the studied strains and the names of the primers)

штаммов *B. thuringiensis* 202, 685, 708, 787, 902, 942, 989, 10/Н, 0162, 0332, 0337, 0352, 0361, 0363, 0371, 0376, 0379, 0399, 0391, 0409, 109-С, Z-52, 358, 4301, 41Н1, 109Н10. Показано наличие генов класса Vip в геномах штаммов *B. thuringiensis* 942, 989, 0162, 358.

Анализ частоты встречаемости генов токсинообразования позволил установить, что большая часть коллекции (95,1%) имеет в геноме ген экзотоксина, что свидетельствует о высокой активности коллекции энтомопатогенных штаммов против вредителей из отрядов Hemiptera и Lepidoptera (табл. 3). Следует заметить, что ген *thuE* детектирован у штаммов 836, 942, 10/Н, 0308, 0379, 0391, Z-52, относящихся к серотипам *kurstaki* и *dendrolimus*, для которых биохимическими методами установлено отсутствие экзотоксина. Вероятно, это связано с тем, что, несмотря на наличие аппарата синтеза, искомый токсин не синтезируется в значительных количествах. Основная часть коллекции содержит в геноме ген *cry1* (63,9%), активный против вредителей из отрядов Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Gastropoda. 44,2% штаммов, имеющих ген *cry11*, потенциально активны против вредителей из отрядов Diptera и Hemiptera. 29,5% штаммов *B. thuringiensis*, имеющих в геноме ген *cry4*, потенциально активны против Diptera. Также 21,3% штаммов имеют в геноме *cry7-8* и могут быть активны против Lepidoptera и Coleoptera.

Установлено, что в коллекции *B. thuringiensis* присутствуют штаммы, потенциально активные против Hymenoptera, Rhabditida и имеющие ген *cry5* (4,91%). 6,55% штаммов имеют в геноме гены группы *vip*. Гены *cry2* и *cry9* представлены в коллекции не более чем в 1,6% штаммов. Гены *cyt1* и *cyt2* при помощи изученных праймеров не обнаружены.

Основным результатом данных поисковых исследований стал отбор перспективных штаммов *B. thuring-*

iensis коллекции, содержащих не менее четырех генов токсинообразования. Ими оказались штаммы 708 (*cry1, thuE, cry7-8, cry11*), 942 (*cry1, thuE, cry11, vip*), 949 (*cry1, thuE, cry4, cry7-8*), 989 (*cry1, thuE, cry11, vip*), 0162 (*cry1, thuE, cry11, vip*), 0307 (*cry1, thuE, cry4, cry7-8*), 0308 (*cry1, thuE, cry4, cry7-8*), 0363 (*cry1, thuE, cry5, cry11*) и 0371 (*cry1, thuE, cry9, cry11*).

Таблица 3. Частота встречаемости cry-подобных генов в штаммах *Bacillus thuringiensis*

Table 3. Frequency of cry-like genes occurrence in *Bacillus thuringiensis* strains

Ген	Частота, %	Отряды целевых вредителей
<i>cry1</i>	63,9	Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Gastropoda
<i>thuE</i>	95,1	Hemiptera, Lepidoptera
<i>cry2</i>	1,63	Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera
<i>cry4</i>	29,5	Diptera
<i>cry5</i>	4,91	Hymenoptera, Rhabditida
<i>cry7-8</i>	21,3	Lepidoptera, Coleoptera
<i>cry9</i>	1,6	Lepidoptera, Coleoptera
<i>cry11</i>	44,2	Diptera, Hemiptera
<i>cyt1</i>	0	Coleoptera, Diptera
<i>cyt2</i>	0	Coleoptera, Diptera
<i>vip</i>	6,55	Lepidoptera

В результате исследований энтомоцидной активности перспективных штаммов относительно спектра вредителей было установлено, что наиболее эффективными против колорадского жука и ильмового листодея являются штаммы *B. thuringiensis* 708, 989, 0162, 0363 и 0371 (табл. 4). Энтомоцидная активность данных штаммов относительно колорадского жука на 10-е сутки после

Таблица 4. Энтимоцидная активность штаммов *Bacillus thuringiensis* против распространенных листогрызущих вредителей овощных и декоративных насаждений Крыма

Table 4. Entomocidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains against common leaf-eating pests of vegetable and ornamental plantings in the Crimea

Штамм	Гибель на 10-е сутки опыта, %					
	личинки колорадского жука (L_{1-2})	личинки ильмового листоеда (L_1)	гусеницы плодовой моли (L_{1-2})	гусеницы капустной совки (L_{1-2})	гусеницы златогузки (L_{1-2})	гусеницы американской белой бабочки (L_{1-2})
Контроль (вода)	6,7±0,1	11,6±1,6	0	2,7±0,1	0	5,3±0,3
98 (эталон)	92,3±0,1	81,6±1,6	100	93,3±0,1	100	100
0293 (эталон)	50,1±0,1	40,0±6,1	100	89,8±0,3	87,3±0,3	100
708	100	91,7±6,2	100	100	73,2±6,9	100
942	27,0±1,0	21,0±0,4	100	84,6±0,6	80,0±2,8	95,6±0,7
949	37,0±1,0	38,3±0,7	100	98,4±2,5	90,3±0,3	100
989	100	88,4±3,5	100	98,7±0,7	75,3±3,7	100
0162	100	98,2±6,6	100	100	100	100
0307	89,3±0,7	95,6±4,2	100	100	100	100
0308	22,0±0,3	18,3±0,2	100	81,7±1,4	97,1±3,4	100
0363	100	88,3±1,3	100	100	100	100
0371	100	94,2±0,4	100	92,3±0,7	98,7±0,3	100

обработки листьев составила в среднем 100%, а относительно ильмового листоеда – 92,5%. Самой высокой активностью против ильмового листоеда обладал штамм *B. thuringiensis* 0162 (98,2%). Все перспективные штаммы оказались высокоактивными против плодовой моли и американской белой бабочки. Штаммы *B. thuringiensis* 708, 0162 и 0307 оказались высокоактивными против гусениц капустной совки, вызывая их 100%-ю гибель на 7-е сутки эксперимента. Обработка корма штаммами *B. thuringiensis* 949, 989 и 0371 способствовала гибели в среднем 96,3% гусениц, а штаммами 942 и 0308 – в среднем 82,5% на 10-е сутки опыта. Максимальным энтимоцидным эффектом на гусениц златогузки обладали штаммы *B. thuringiensis* 0162 и 0307 (100%-я гибель на 10-е сутки опыта), высокую активность проявляют штаммы *B. thuringiensis* 0308 и 0371, вызывающие в среднем 97,5%-ю гибель вредителя в тот же срок. На основе анализа полученных результатов из всех исследуемых патогенов в качестве наиболее эффективных против вредителей отрядов Coleoptera и Lepidoptera были отобраны четыре штамма *B. thuringiensis*: 0162, 0307, 0363 и 0371.

Совокупность протектированных генов энтимоцидной активности в жидкой культуре (*cry1*, *thuE*, *cry9*, *cry11*) и высокая энтимоцидная активность показали перспективность дальнейшего изучения технологических параметров культивирования штамма *B. thuringiensis* 0371.

Энтомопатоген культивировали в дрожже-полисахаридной среде при температуре 28–30 °С на технологической качалке (220 об/мин) в течение 48 ч. Установлено, что для бактерий в стадии вегетативных клеток характерна кинетика роста и развития, которая состоит из 4 классических фаз: Lag-фазы, фазы ускорения роста, экспоненциальной и стационарной фаз. Lag-фаза развития бактерий проходит в течение 0,5–1,5 ч, а последующие фазы развития вегетативных клеток – до 10–12 ч (табл. 5). Титр колониеобразующих единиц за этот период достигает 0,5–0,8 млрд клеток в 1 мл жидкости.

Через 14–16 ч культивирования в вегетативных клетках отмечали начало активного формирования белковых кристаллов и спорогенных зон. Период массовой споруляции проходил через 20–24 ч. Весь период культивирования составлял 45–48 ч и заканчивался полным высвобождением спор из спорангиев. Конечный титр свободных спор достигает 2,0–2,7 млрд в 1 мл.

Таблица 5. Технологические показатели развития штамма *Bacillus thuringiensis* 0371 при культивировании в дрожже-полисахаридной среде

Table 5. Technological indicators of the strain *Bacillus thuringiensis* 0371 development when cultivated in a yeast-polysaccharide medium

Этап развития бактерий	Период наблюдений, ч
Этап 1. Начало образования спорогенных зон	14–16
Этап 2. Массовая споруляция	20–24
Этап 3. 10% свободных спор	28–30
Этап 4. Полный выход спор и кристаллов	45–48

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования установлено, что 95,1% штаммов коллекции имеют в геноме ген β -эзотоксина и 63,9% – ген *cry1*, что свидетельствует об их высокой активности против вредителей из отрядов Hemiptera и Lepidoptera. Описано наличие генов, потенциально активных против вредителей из отрядов Diptera и Hemiptera: *cry11* у 44,2% и *cry4* у 29,5% штаммов коллекции. Показано, что в коллекции *B. thuringiensis* присутствуют штаммы, потенциально активные против представителей отрядов Hymenoptera, Rhabditida и имеющие ген *cry5* (4,91%).

В качестве наиболее перспективных для создания на их основе биопрепаратов, содержащих не менее четырех генов токсинообразования, отобраны штаммы *B. thuringiensis* 708 (*cry1, thuE, cry7-8, cry11*), 942 (*cry1, thuE, cry11, vip*), 949 (*cry1, thuE, cry4, cry7-8*), 989 (*cry1, thuE, cry11, vip*), 0162 (*cry1, thuE, cry11, vip*), 0307 (*cry1, thuE, cry4, cry7-8*), 0308 (*cry1, thuE, cry4, cry7-8*), 0363 (*cry1, thuE, cry5, cry11*) и 0371 (*cry1, thuE, cry9, cry11*).

Установлено, что выделенные штаммы *B. thuringiensis* 0162, 0307, 0363 и 0371 оказывают высокое энтомопатогенное действие против личинок колорадского жука, ильмового листоеда (88,3–100%), гусениц

плодовой моли, капустной совки, златогузки и американской бабочки (92,3–100%).

Показано, что штамм *B. thuringiensis* 0371 является технологичным, так как проходит все классические фазы развития и в течение 45–48 ч демонстрирует полный выход кристаллов и спор из спорангия.

Таким образом, наличие генов энтомоцидной активности в жидкой культуре (*cry1, thuE, cry9, cry11*) и высокое энтомопатогенное действие характеризуют штамм *B. thuringiensis* 0371 как перспективный для разработки регламента производства биопрепарата для защиты сельскохозяйственных растений.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Arthurs S., Dara S.K. Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States // Journal of Invertebrate Pathology. 2019. Vol. 165. P. 13–21. DOI: 10.1016/j.jip.2018.01.008.
2. Jouzani G.S., Valijanjan E., Sharafi R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings // Applied Microbiology and Biotechnology. 2017. Vol. 101. P. 2691–2711. DOI: 10.1007/s00253-017-8175-y.
3. Duarte Neto J.M.W., Wanderley M.C.A., da Silva T.A.F., Marques D.A.V., da Silva G.R., Gurgel J.F., et al. *Bacillus thuringiensis* endotoxin production: a systematic review of the past 10 years // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2020. Vol. 36. P. 128. DOI: 10.1007/s11274-020-02904-4.
4. Jo H., Tägele S.B., Pham H.Q., Kim M.-C., Choi S.-D., Kim M.-J., et al. Response of soil bacterial community and pepper plant growth to application of *Bacillus thuringiensis* KNU-07 // Agronomy. 2020. Vol. 10, no. 4. P. 551. DOI: 10.3390/agronomy10040551.
5. Perez M.P., Sauka D.H., Onco M.I., Berretta M.F., Benintende G.B. Selection of *Bacillus thuringiensis* strains toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*, Coleoptera: Curculionidae) larvae // Revista Argentina de Microbiología. 2017. Vol. 49, no. 3. P. 264–272. DOI: 10.1016/j.ram.2016.12.010.
6. Soleymani S., Sarrafzadeh M.-H., Mostoufi N. Modeling of fermentation process of *Bacillus thuringiensis* as a sporulating bacterium // Chemical Product and Process Modeling. 2019. Vol. 14, no. 2. P. 2018000. DOI: 10.1515/cppm-2018-0007.
7. Guttman D.M., Ellar D.J. Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors // FEMS Microbiology Letters. 2000. Vol. 188, no. 1. P. 7–13. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09160.x.
8. Hansen B.M., Hendriksen N.B. Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis // Applied and Environmental Microbiology. 2001. Vol. 67, no. 1. P. 185–189. DOI: 10.1128/AEM.67.1.185-189.2001.
9. Palma L., Muñoz D., Berry C., Murillo J., Caballero P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity // Toxins (Basel). 2014. Vol. 6, no. 12. P. 3296–3325. DOI: 10.3390/toxins6123296.
10. Fang Y., Li Z., Liu J., Shu C., Wang X., Zhang X., et al. A pangenomic study of *Bacillus thuringiensis* // Journal of Genetics and Genomics. 2011. Vol. 38, no. 12. P. 567–576. DOI: 10.1016/j.jgg.2011.11.001.
11. Lee M.K., Walters F.S., Hart H., Palekar N., Chen J.-S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin // Applied and Environmental Microbiology. 2003. Vol. 69, no. 8. P. 4648–4657. DOI: 10.1128/AEM.69.8.4648-4657.2003.
12. Sena J.A., Hernández-Rodríguez C.S., Ferré J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with Spodoptera frugiperda midgut binding sites // Applied and Environmental Microbiology. 2009. Vol. 75, no. 7. P. 2236–2237. DOI: 10.1128/AEM.02342-08.
13. Bravo A., Likitvivatanavong S., Gill S.S., Soberón M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide // Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2011. Vol. 41, no. 7. P. 423–431. DOI: 10.1016/j.ibmb.2011.02.006.
14. Crickmore N., Zeigler D.R., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., et al. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1998. Vol. 62, no. 3. P. 807–813. DOI: 10.1128/MMBR.62.3.807-813.1998.
15. Van Frankenhuyzen K. Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins // Journal of Invertebrate Pathology. 2013. Vol. 114, no. 1. P. 76–85. DOI: 10.1016/j.jip.2013.05.010.
16. Ben-Dov E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins // Toxins (Basel). 2014. Vol. 6, no. 4. P. 1222–1243. DOI: 10.3390/toxins6041222.
17. De Maagd R.A., Bravo A., Berry C., Crickmore N., Schnepf H.E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria // Annual Review of Genetics. 2003. Vol. 37. P. 409–433. DOI: 10.1146/annurev.genet.37.110801.143042.
18. Chougule N.P., Bonning B.C. Toxins for transgenic resistance to hemipteran pests // Toxins (Basel). 2012. Vol. 4, no. 6. P. 405–429. DOI: 10.3390/toxins4060405.
19. Ohba M., Mizuki E., Uemori A. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis* // Anticancer Research. 2009. Vol. 29, no. 1. P. 427–433.
20. Zheng J., Gao Q., Liu L., Liu H., Wang Y., Peng D., et al. Comparative genomics of *Bacillus thuringiensis* reveals a path to specialized exploitation of multiple invertebrate hosts // mBio. 2017. Vol. 8, no. 4. P. e00822-17. DOI: 10.1128/mBio.00822-17.
21. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // BMC Bioinformatics. 2012. Vol. 13. P. 134. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.
22. Franco-Rivera A., Benintende G., Cozzi J., Baizabal-Aguirre V.M., Valdez-Alarcón J.J., López-Meza J.E.

Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina // Antonie Van Leeuwenhoek. 2004. Vol. 86, no. 1. P. 87–92. DOI: 10.1023/B:ANTO.0000024913.94410.05.

23. Willumsen P.A., Johansen J.E., Karlson U. Isolation and taxonomic affiliation of N-heterocyclic aromatic hydrocarbon-transforming bacteria // Applied Microbiology and Biotechnology. 2005. Vol. 67, no. 3. P. 420–428. DOI: 10.1007/s00253-004-1799-8.

24. Bravo A., Sarabia S., Lopez L., Ontiveros H., Abarca C., Ortiz A., et al. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection // Applied and Environmental Microbiology. 1998. Vol. 64, no. 12. P. 4965–4972. DOI: 10.1128/AEM.64.12.4965-4972.1998.

25. Jain D., Sunda S.D., Sanadhya S., Nath D.J., Khandelwal S.K. Molecular characterization and PCR-based screening of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains // 3 Biotech. 2017. Vol. 7, no. 1. P. 4. DOI: 10.1007/s13205-016-0583-7.

26. PCR primer design / ed. A. Yuryev. Totowa: Humana Press, 2007. 431 p.

27. Хайлафян А.А. Современные статистические методы медицинских исследований: монография. М.: Ленанд, 2014. 320 с.

28. Natingga D. Data science algorithms in a week. Birmingham – Mumbai: Packt Publishing, 2018. 214 p.

29. Galea A. Applied data science with Python and Jupyter. Birmingham – Mumbai: Packt Publishing, 2018. 174 p.

REFERENCES

1. Arthurs S., Dara S.K. Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2019;165:13-21. DOI: 10.1016/j.jip.2018.01.008.

2. Jouzani G.S., Valijanjan E., Sharafi R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017;101:2691-2711. DOI: 10.1007/s00253-017-8175-y.

3. Duarte Neto J.M.W., Wanderley M.C.A., da Silva T.A.F., Marques D.A.V., da Silva G.R., Gurgel J.F., et al. *Bacillus thuringiensis* endotoxin production: a systematic review of the past 10 years. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2020;36:128. DOI: 10.1007/s11274-020-02904-4.

4. Jo H., Tagele S.B., Pham H.Q., Kim M.-C., Choi S.-D., Kim M.-J., et al. Response of soil bacterial community and pepper plant growth to application of *Bacillus thuringiensis* KNU-07. *Agronomy*. 2020;10(4):551. DOI: 10.3390/agronomy10040551.

5. Perez M.P., Sauka D.H., Onco M.I., Berretta M.F., Benintende G.B. Selection of *Bacillus thuringiensis* strains toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*, Coleoptera: Curculionidae) larvae. *Revista Argentina de Microbiología*. 2017;49(3):264-272. DOI: 10.1016/j.ram.2016.12.010.

6. Soleymani S., Sarrafzadeh M.-H., Mostoufi N. Modeling of fermentation process of *Bacillus thuringiensis* as a sporulating bacterium. *Chemical Product and Process Modeling*. 2019;14(2):2018000. DOI: 10.1515/cppm-2018-0007.

7. Guttman D.M., Ellar D.J. Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors. *FEMS Microbiology Letters*. 2000;188(1):7-13. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09160.x.

8. Hansen B.M., Hendriksen N.B. Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001. Vol. 67, no. 1. P.185–189. DOI: 10.1128/AEM.67.1.185-189.2001.

9. Palma L., Muñoz D., Berry C., Murillo J., Caballero P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins (Basel)*. 2014;6(12):3296-3325. DOI: 10.3390/toxins6123296.

10. Fang Y., Li Z., Liu J., Shu C., Wang X., Zhang X., et al. A pangenomic study of *Bacillus thuringiensis*.

Journal of Genetics and Genomics. 2011;38(12):567-576. DOI: 10.1016/j.jgg.2011.11.001.

11. Lee M.K., Walters F.S., Hart H., Palekar N., Chen J.-S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003;69(8):4648-4657. DOI: 10.1128/AEM.69.8.4648-4657.2003.

12. Sena J.A., Hernández-Rodríguez C.S., Ferré J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with Spodoptera frugiperda midgut binding sites. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(7):2236-2237. DOI: 10.1128/AEM.02342-08.

13. Bravo A., Likitvivatanavong S., Gill S.S., Soberón M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2011;41(7):423-431. DOI: 10.1016/j.ibmb.2011.02.006.

14. Crickmore N., Zeigler D.R., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., et al. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998;62(3):807-813. DOI: 10.1128/MMBR.62.3.807-813.1998.

15. 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.

16. Ben-Dov E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. *Toxins (Basel)*. 2014;6(4):1222-1243. DOI: 10.3390/toxins6041222.

17. De Maagd R.A., Bravo A., Berry C., Crickmore N., Schnepf H.E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics*. 2003;37:409-433. DOI: 10.1146/annurev.genet.37.110801.143042.

18. Chougule N.P., Bonning B.C. Toxins for transgenic resistance to hemipteran pests. *Toxins (Basel)*. 2012;4(6):405-429. DOI: 10.3390/toxins4060405.

19. Ohba M., Mizuki E., Uemori A. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Research*. 2009;29(1):427-433.

20. Zheng J., Gao Q., Liu L., Liu H., Wang Y., Peng D., et al. Comparative genomics of *Bacillus thuringiensis* reveals a path to specialized exploitation of multiple invertebrate hosts. *mBio*. 2017;8(4):e00822-17. DOI: 10.1128/mBio.00822-17.

21. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific

primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.

22. Franco-Rivera A., Benintende G., Cozzi J., Baizabal-Aguirre V.M., Valdez-Alarcón J.J., López-Meza J.E. Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2004;86(1):87-92. DOI: 10.1023/B:ANTO.0000024913.94410.05.

23. Willumsen P.A., Johansen J.E., Karlson U. Isolation and taxonomic affiliation of N-heterocyclic aromatic hydrocarbon-transforming bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005;67(3):420-428. DOI: 10.1007/s00253-004-1799-8.

24. Bravo A., Sarabia S., Lopez L., Ontiveros H., Abarca C., Ortiz A., et al. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied*

and Environmental Microbiology. 1998;64(12):4965-4972. DOI: 10.1128/AEM.64.12.4965-4972.1998.

25. Jain D., Sunda S.D., Sanadhya S., Nath D.J., Khandelwal S.K. Molecular characterization and PCR-based screening of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains. *3 Biotech*. 2017;7(1):4. DOI: 10.1007/s13205-016-0583-7.

26. Yuryev A. *PCR primer design*. Totowa: Humana Press; 2007, 431 p.

27. Khalafyan A.A. *Modern statistical methods of medical research*. Moscow: Lenand; 2014, 320 p. (In Russian).

28. Natingga D. *Data science algorithms in a week*. Birmingham – Mumbai: Packt Publishing; 2018, 214 p.

29. Galea A. *Applied data science with Python and Jupyter*. Birmingham – Mumbai: Packt Publishing; 2018, 174 p.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ

Крыжко Анастасия Владимировна,
к.с.-х.н., ведущий научный сотрудник,
Научно-исследовательский институт
сельского хозяйства Крыма,
295453, г. Симферополь, ул. Киевская, 150,
Российская Федерация,
nk_lib@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5401-0579>

Вклад автора

Автор выполнил исследовательскую работу, на основании полученных результатов провел обобщение, подготовил рукопись к печати.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Автор прочел и одобрил окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 20.08.2024.
Одобрена после рецензирования 05.11.2024.
Принята к публикации 30.11.2024.

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Anastasiia V. Kryzhko,
Cand. Sci. (Agriculture), Leading Researcher,
Research Institute of Agriculture of Crimea,
150, Kievskaya St., Simferopol, 295453,
Russian Federation,
nk_lib@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5401-0579>

Contribution of the author

The author performed the research, made a generalization on the basis of the results obtained and prepared the manuscript for publication.

Conflict interests

Author declares no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by the author.

Information about the article

The article was submitted 20.08.2024.
Approved after reviewing 05.11.2024.
Accepted for publication 30.11.2024.