

УДК 632.937:632.76:633.491

ЭНДОФИТНЫЕ ШТАММЫ *BACILLUS THURINGIENSIS* ДЛЯ РАЗРАБОТКИ СРЕДСТВ КОНТРОЛЯ ЧИСЛЕННОСТИ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА В ПОСАДКАХ КАРТОФЕЛЯ¹

© 2023 г. А. В. Сорокань^{1,*}, Г. В. Беньковская¹, И. С. Марданшин²,
В. Ю. Алексеев¹, С. Д. Румянцев¹, И. В. Максимов¹

¹Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение
Уфимского федерального исследовательского центра РАН
450054 Уфа, просп. Октября 71, Россия

²Башкирский институт сельского хозяйства — обособленное структурное подразделение
Уфимского федерального исследовательского центра РАН
450059 Уфа, ул. Рихарда Зорге 19, Россия

*E-mail: fourtyanns@googlegmail.com

Поступила в редакцию 25.11.2022 г.

После доработки 13.01.2023 г.

Принята к публикации 16.02.2023 г.

В настоящее время поиск штаммов *B. thuringiensis* для использования в качестве агентов биологического контроля основан на их токсичности для насекомых в лабораторных тестах. В то же время ряд штаммов этих бактерий способен существовать в симбиотических отношениях с растениями-хозяевами, в том числе являясь эндофитами. Способность штаммов *B. thuringiensis* проникать во внутренние ткани растений оценивали путем подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) микроорганизмов через 7 сут после инокуляции стерильных растений картофеля в пробирках; инсектицидную активность проверяли на личинках 3-го возраста, полученных от перезимовавших взрослых особей колорадского жука, собранных с полей в Чишминском и Иглинском р-нах Башкортостана. Показали, что штамм *B. thuringiensis* В-5351, который заселяет поверхность (50.0 ± 8.1 КОЕ $\times 10^5$ /г) и внутренние ткани (38.9 ± 9.6 КОЕ $\times 10^5$ /г) побегов растений, но обладает меньшей инсектицидной активностью, чем штамм *B. thuringiensis* В-5689, который проявляет высокую инсектицидную активность и колонизирует в основном корни растений (25.4 ± 3.8 КОЕ $\times 10^5$ /г), уменьшил колонизацию посевов картофеля колорадским жуком, а также увеличил урожай клубней в 2-летнем эксперименте (2020–2021 гг.). Под влиянием *B. thuringiensis* В-5351 наблюдали уменьшение количества личинок раннего возраста в отличие от *B. thuringiensis* В-5689, который вызывал более длительные процессы метаморфоза. По-видимому, эффект *B. thuringiensis* В-5351 заключался в гибели насекомых. Важно, чтобы обработка *B. thuringiensis* В-5351 способствовала значительному снижению количества личинок последнего возраста на посевах, обработанных этим штаммом, а также степени дефолиации растений вредителем, чего не наблюдали при действии *B. thuringiensis* В-5689. На обработанных *B. thuringiensis* В-5351 делянках увеличивался выход товарных клубней и общей урожайности. Предложен метод изучения эндофитного потенциала штаммов по отношению к наземной части растений для поиска агентов биоконтроля в качестве основы для создания алгоритмов построения микробиомов в агроценозах.

Ключевые слова: *Leptinotarsa decemlineata*, *Solanum tuberosum*, *Bacillus thuringiensis*, биоконтроль, урожайность.

DOI: 10.31857/S0002188123050083, **EDN:** USIKJG

ВВЕДЕНИЕ

Колорадский жук (КЖ) *Leptinotarsa decemlineata* Say — это важнейший вредитель картофеля, обладающий высоким адаптивным потенциалом [1]. На территорию Южного Урала и Поволжья вреди-

тель был завезен в 1975 г. и в дальнейшем распространился повсеместно [2]. До недавнего времени казалось, что для решения проблемы распространения КЖ достаточно рационального использования инсектицидов. Однако устойчивые к фосфорорганическим соединениям особи КЖ в ряде районов Республики Башкортостан были обнаружены уже в 1990-х гг. [2], к фипронилу — в 2006 г.

¹ Исследование выполнено в рамках проекта РНФ 20-76-00003.

[3]. К сожалению, на практике формирование резистентности вредителя к инсектицидам вынуждает сельхозпроизводителей увеличивать дозу применяемых веществ, способствуя формированию еще более устойчивых к ним популяций насекомых [4]. В этих условиях биологические пестициды привлекают к себе большое внимание, особенно благодаря выясненным недавно качествам бактерий рода *Bacillus*, способным не только обеспечить контроль численности целевых насекомых на обработанных растениях, но и существенно повысить иммунитет самих растений, а также регулировать их ростовые показатели, что несомненно впоследствии отражается на продуктивности [5].

В настоящее время в мире до 90% всех коммерческих биоинсектицидов производят на основе штаммов *Bacillus thuringiensis*. К данному моменту известно более 70 подвидов и 818 Cry-токсинов *B. thuringiensis*. По всему миру [6] интерес к поиску новых штаммов, их выделению из окружающей среды и селекции не ослабевает. Однако в популяциях насекомых, точно так же как и против химических инсектицидов, со временем развивается резистентность к Cry-токсинам, как и к другим классам инсектицидов [7]. Кроме того, главным недостатком препаратов на их основе является высокая чувствительность белковых токсинов к ультрафиолету [8]. Поэтому поиск штаммов, на основе которых будут разработаны биопрепараты, должен быть основан не только на данных о непосредственной инсектицидной активности вырабатываемых бактериями токсинов, но и на способности штаммов вступать в эндофитные отношения с растением-хозяином [9] на этапе лабораторных испытаний. Например, в последние годы сообщали о штаммах *B. thuringiensis*, которые могут существовать эндофитно, т.е. во внутренних тканях растений, где они защищены от внешних воздействий [10, 11] и способны индуцировать защитные реакции растений против фитофагов [11].

Цель работы – исследование инсектицидности и “эндофитности” бактерий как маркеров эффективности штаммов *B. thuringiensis* для разработки биопрепаратов, компоненты которых могли бы интегрироваться в состав агробиоценоза в качестве агентов биоконтроля.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения экспериментов использованы штаммы бактерий *B. thuringiensis* В-5689, *B. thuringiensis* В-5351 из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики Уфимского федерального иссле-

довательского центра РАН. Бактерии культивировали на среде *LB* (0.5 г NaCl /л) в камере “ТС 1/20” (СПУ, Россия) при температуре 28°C. Для оценки инсектицидной активности и влияния на урожайность картофеля использовали 16-часовые культуры. Титр клеток определяли при 600 нм на спектрофотометре “BioSpec-Mini” (Shimadzu, Япония).

Способность штаммов проникать во внутренние ткани растений оценивали путем подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) микроорганизмов через 7 сут после инокуляции стерильных пробирочных растений картофеля (сорт Ранняя Роза), культивируемых в течение 14 сут при 16-часовом освещении на агарозной среде Мурасиге–Скуга в климатостате “KBW E6” (Binder GmbH, Германия). Не менее 20 растений инокулировали 5 μ л суспензии каждого штамма (10^8 клеток/мл) путем нанесения на поверхность нижней части стебля непосредственно в пробирочной культуре. Для оценки количества КОЕ на поверхности растений 100 мг образцов (надземная часть и корни) каждого отдельного экспериментального растения погружали в 30 мл стерильной дистиллированной воды на 30 мин при встряхивании (орбитальный шейкер “OS-20”, Biosan, Латвия). Затем извлеченные растения подвергали поверхностной стерилизации в следующем порядке: 70% этанол (1 мин) → 0.1% диацид-1 (3 мин) → дистиллированная вода [11]. Образцы гомогенизировали в стерильных пакетах с помощью блендера “BagMixer 400 W” (Interscience, Франция) с добавлением 2 мл стерильной воды. Затем проводили 2 последовательных 10-кратных разведения полученного гомогената. Аликвоты (50 мкл) смывов с поверхности и гомогенатов при помощи шпателя Дригальского распределяли по поверхности картофельно-глюкозного агара до полного высыхания. Затем чашки Петри инкубировали при 28°C в термостате “ТС-1/20 СПУ” (ООО Смоленское СКТБ СПУ, Россия) в течение 24 ч. КОЕ подсчитывали во 2-м и 3-м разведении, количество пересчитывали на 1 г сырой массы растения.

Инсектицидные свойства штаммов. В экспериментах использовали личинки 3-го возраста, полученные от перезимовавших имаго КЖ, собранных в посадках картофеля в Чишминском (выборка 20.02) и Иглинском (выборка 20.03) р-нах Республики Башкортостан. Пробирочные стерильные растения (сорт Ранняя Роза) погружали в суспензию бактериальных культур (10^8 клеток/мл) на 30 сек, затем просушивали на фильтровальной бумаге. Подсушенные растения помещали в чашки Петри с 20-ю личинками в 4-кратной повторности. В контроле корм обрабатывали стерильной

средой *LB*. До конца наблюдений личинкам давали свежий необработанный корм через каждые 24 ч. Фиксировали смертность личинок на 3-и, 5-е и 7-е сут после начала эксперимента.

Полевые эксперименты. Исследования проводили на полях Уфимского федерального научного центра РАН (опытная станция г. Бирск, 55°25'47.4"N 55°35'49.9" E) в посевных сезонах 2019 и 2020 гг. Поля располагались на дерново-подзолистых почвах. Почвы не заболочены, по текстуре супесчаные. Содержание гумуса – 3.2%, рН почвы 5.5–6.5 [12]. Фосфорные (P_{cr}) и калийные (K_c) удобрения вносили осенью под зяблевую обработку, азотные (N_{aa}) – весной под перепахку в дозе N90P60K90.

Клубни картофеля сорта Удача высаживали в 3-х повторностях по 40 растений на делянку для каждого варианта 20 мая (2020 г.) и 26 мая (2021 г.) на глубину 8–10 см, по схеме посадки 75 × 30 см (ширина междурядий 75 см, расстояние в рядке 30 см). Планируемая густота стояния растений – 45000 шт./га. Использовали сажалку “Grimme GL 34T” (ГРИММЕ-Рус, Россия). Двухнедельные проростки опрыскивали суспензией экспериментальных штаммов *B. thuringiensis* (10^6 клеток/растение). В контрольном варианте растения опрыскивали водой.

Плотность популяции КЖ наблюдали на 0-, 7-, 17- и 31-е сут после первой обработки в 2020 г. и на 0-, 8-, 17- и 29-е сут в 2021 г. Подсчитывали ($\pm SE$) число кладок, количество яиц, личинок I–IV возрастов и имаго на одно растение в зависимости от обработок. Дефолиацию, вызванную КЖ, оценивали визуально на основе процентной системы ранжирования, в которой 100% соответствовало полной дефолиации растений, а 0 – отсутствию повреждений. Растения, прилегающие к свободным промежуткам между делянками, не обследовали во избежании краевого эффекта.

Клубни картофеля собирали на 65-е (2020 г.) и 60-е (2021 г.) сут после первой обработки со всех 40 растений на делянке. В день сбора урожая клубни разделяли на 3 фракции: мелкие (<50 г), семенные (от 50 до 80 г), крупные (>80 г) и взвешивали отдельно.

Статистическая обработка. Лабораторные опыты повторяли в трехкратной повторности. Средние величины со стандартными ошибками ($\pm SE$) приведены на рисунках и в таблицах. Статистический анализ проводили с использованием Microsoft Excel 2013 для Windows (Microsoft Corporation, США) и IBM SPSS Statistics 12.0 (IBM Corporation, США). Различия исследованных параметров между отдельными обработками анали-

Таблица 1. Содержание клеток штаммов *B. thuringiensis* на поверхности и во внутренних тканях растений картофеля, КОЕ × 10^5 /г

Локализация	Штаммы <i>B. thuringiensis</i>	
	B-5689	B-5351
Поверхность побега	22.3 ± 6.6a	50.0 ± 8.1b
Ткани листа	7.75 ± 2.19a	38.9 ± 9.6b
Корень	25.4 ± 3.8a	0.50 ± 0.13b

зировали с использованием дисперсионного анализа. Данные в таблицах, помеченные одним и тем же символом, существенно не отличались друг от друга в соответствии с *HSD*-тестом Тьюки при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе проводили оценку способности штаммов заселять ткани стерильных растений картофеля. Выявлено, что к 7 сут после инокуляции *B. thuringiensis* B-5689 на поверхности побегов картофеля (надземная часть) находилось в 2 раза меньше жизнеспособных клеток, и более чем в 4 раза меньше – во внутренних тканях побега, чем в случае обработки растений штаммом *B. thuringiensis* B-5351 (табл. 1). При этом в корнях инокулированных клетками штамма *B. thuringiensis* B-5689, напротив, число КОЕ бактерий оказалось на 2 порядка больше, чем *B. thuringiensis* B-5351. То есть штамм B-5689 предпочитал заселять в большей степени корневую систему в сравнении со штаммом B-5351. Важно отметить, что инокуляцию производили в одной точке в нижней части поверхности стебля (без их механического повреждения), после чего бактериальные клетки системно распространились во все органы растений.

На следующем этапе была оценена инсектицидность экспериментальных штаммов. Оказалось, что штамм *B. thuringiensis* B-5689 вызывал смертность личинок КЖ уже через 3 сут после кормления суспензией клеток на более чем 20%, а к 7 сут – 95–100% (рис. 1). В то же время клетки штамма B-5351 характеризовались меньшей эффективностью и вызывали смертность только 60% личинок КЖ. Соответственно, бактерии *B. thuringiensis* B-5689 способствовали значительно большей гибели личинок КЖ, чем клетки штамма *B. thuringiensis* B-5351. Таким образом, хотя штамм *B. thuringiensis* B-5689 и обладал в лабораторных исследованиях большей инсектицидностью в сравнении со штаммом *B. thuringiensis* B-5351, он, в связи с невысокой способностью

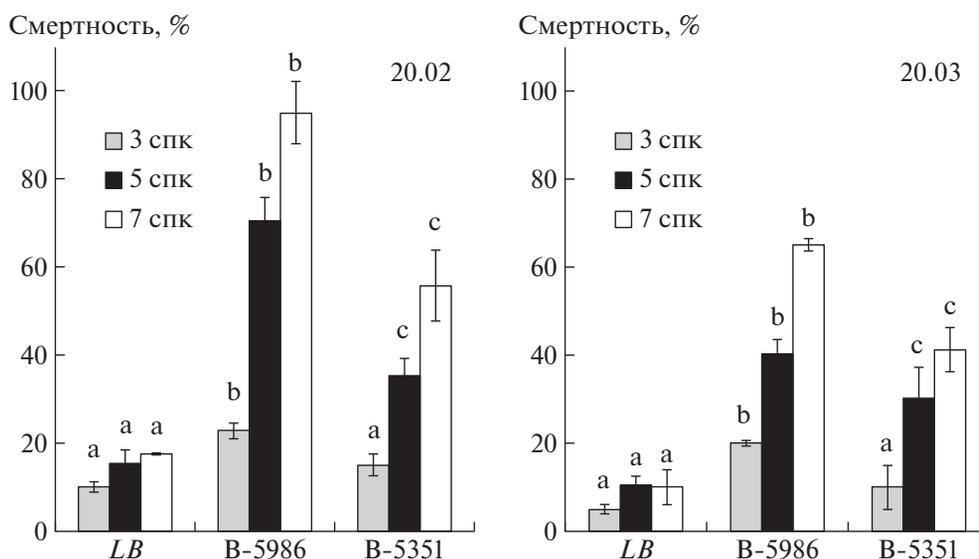


Рис. 1. Влияние *B. thuringiensis* B-5986 и B-5351 на смертность личинок III возраста КЖ: спк – сутки после кормления; LB – листья, обработанные LB (контроль).

*Буквами отмечены статистически значимые отличия показателей, наблюдаемых в соответствующей временной точке (при $p \leq 0.05$).

существовать эндофитно в надземной части растений, в условиях вегетации проявил меньший защитный потенциал.

В течение 2-х сезонов (2020 и 2021 гг.) исследовали влияние бактериальных штаммов на заселенность посадок КЖ на всех стадиях жизненного цикла. Определили статистически значимые различия в среднем количестве отложенных КЖ яиц на одно растение между различными вариантами обработок (табл. 2). Влияние штаммов *B. thuringiensis* не наблюдали на начальном этапе после выхода имаго из почвы, но в период массовой откладки число яиц в расчете на 1 растение было значительно меньше на делянках, обработанных штаммом *B. thuringiensis* B-5351. Тогда как количество яиц, отложенных имаго, уменьшилось под влиянием *B. thuringiensis* B-5689 только на более поздних сроках. Стоит отметить, что на контрольных участках и обработанных *B. thuringiensis* B-5689 растениях среднее количество кладок яиц на одно растение увеличилось с 17 июня по 4 июля в 2 раза (2020 г.), но на участках, обработанных штаммом *B. thuringiensis* B-5351 этот показатель оставался низким. В 2021 г. все исследованные штаммы снижали максимальные показатели количества кладок за сезон.

Таким образом, штамм *B. thuringiensis* B-5351 более эффективно снижал количество кладок и количество яиц в кладках на одно растение, отражая их негативное влияние на привлекательность растений для откладывания яиц имаго. Это под-

тверждено 2-летними данными (2020 и 2021 гг.) о количестве особей имаго на растениях картофеля, обработанных исследованными штаммами, в период откладки яиц.

Количество личинок I и II возраста было стабильно на участках, обработанных *B. thuringiensis* B-5351 в 2021 г. На участках посадок картофеля, обработанных суспензией клеток штамма *B. thuringiensis* B-5689, количество личинок I возраста не отличалось от контрольного в течение сезона, а численность личинок II возраста увеличивалась медленнее, чем в контроле. Под воздействием штамма *B. thuringiensis* B-5689 число личинок I возраста снижалось в период массового отрождения, но эффект *B. thuringiensis* B-5351 был более длительным. Число личинок II возраста сокращалось при обработках и тем, и другим штаммом. Количество личинок III возраста на участках посадок картофеля под влиянием клеток штамма *B. thuringiensis* B-5689 в период их массового появления было в 2 раза меньше, чем в контроле, а под влиянием *B. thuringiensis* B-5351 – почти в 10 раз. При этом численность личинок IV возраста на участках посадок картофеля, обработанных штаммом B-5689, не снижалась, а на делянках, обработанных штаммом B-5351, личинки IV возраста обнаруживались позже и в меньшем количестве, чем в других вариантах. По-видимому, обработка растений *B. thuringiensis* B-5351 увеличивала срок, требуемый личинкам для перехода в следующую стадию развития (линьки).

Защитные мероприятия, как и ожидалось, с использованием штаммов бактерий способствовали сохранению урожая картофеля в сравнении. Например, обработка клетками бактерий *B. thuringiensis* В-5351 увеличивала общую урожайность посадок (табл. 3) на 30–35% относительно необработанных участков, что происходило за счет увеличения массы товарных клубней весом >80 г и семенных клубней массой 50–80 г. На участках, обработанных штаммом *B. thuringiensis* В-5689, увеличивалась только масса клубней во фракции 50–80 г. Обработка бактериальными штаммами способствовала снижению общей массы клубней весом <50 г относительно контроля, что свидетельствовало о положительном влиянии испытанных бактериальных штаммов на товарные качества выращенного картофеля.

В настоящее время исследования резистентности насекомых к бактериальным инсектотоксинам в какой-то мере сводят многообещающие возможности применения агентов биоконтроля к инсектицидному воздействию ограниченного класса молекул [13]. Существующий подход к разработке биологических препаратов также основывается на поиске (или получению путем генетической рекомбинации) штаммов, продуцирующих Сгу-белки с наибольшей инсектицидной активностью, т.е. приравнивает биопрепараты на основе штаммов *B. thuringiensis* к химическим инсектицидам [14]. Вместе с тем, как показали наши исследования, и к показателю инсектицидности штаммов в полевых и лабораторных условиях необходимо подходить дифференцированно. Например, рис. 1 показал, что инсектицидный эффект штамма *B. thuringiensis* В-5689 против личинок КЖ значительно больше, чем *B. thuringiensis* В-5351, что делает его, как кажется, более перспективным кандидатом для применения в полевых условиях. Показана способность обоих изученных штаммов формировать с картофелем устойчивую ассоциативную систему хозяин–эндофит. Но, поскольку штамм *B. thuringiensis* В-5351 ассоциирован с надземными органами растений, в то время как *B. thuringiensis* В-5689 – с корневой системой растений, высокая инсектицидная активность суспензии клеток последнего штамма в полевых условиях сходит на нет из-за отсутствия непосредственного контакта с вредителем.

Известно, что 4 бразильских штамма *B. thuringiensis* в растениях капусты колонизировали ткани листа вблизи устьиц, через которые бактерии могут проникать в ткани, т.к. сосуды проводящей ткани продолжали образовывать вегетативные клетки, споры и кристаллы Сгу-белков [10]. Кро-

ме того, показана способность ряда штаммов индуцировать защитные реакции растений против фитопатогенов и стимулировать рост растений [16], однако данных об их взаимодействии с растением-хозяином ничтожно мало. Можно полагать, что колонизация бактериями *B. thuringiensis* внутренних тканей растений позволяет им “уходить” от конкурентного давления со стороны других видов ризобактерий, чему в сильной степени подвергаются другие микроорганизмы, искусственно привнесенные в биоценозы [15].

После кратковременного снижения числа яиц КЖ на обработанных штаммом В-5689 растениях относительно контрольных показателей, откладка яиц самками продолжилась, а количество кладок и имаго не отличалось от наблюдаемых на контрольных участках. Под действием *B. thuringiensis* В-5689 либо снижалось (2020 г.) количество личинок I возраста, либо требовалось большее время для их отрождения и линьки (2021 г.). Эффекта на численность личинок старших возрастов данный штамм не оказывал, что в последующем приводило к значительному повреждению ботвы.

Под влиянием клеток штамма *B. thuringiensis* В-5351 кусты картофеля становились менее привлекательными для откладки яиц самками, на что указывало сокращение количества кладок и яиц в каждой. Наблюдалось снижение количества личинок I возраста на 17-е сут после обработки, при этом в отличие от штамма В-5689, вызывавшего более длительные процессы метаморфоза, по-видимому, эффект *B. thuringiensis* В-5351 заключался в гибели особей. Важно, что *B. thuringiensis* В-5351, присутствуя во внутренних тканях надземной части растений картофеля, способствовал долговременному значительному сокращению численности личинок III и IV возрастов в обработанных этим штаммом посадках. Так как наибольший урон картофелю наносят именно личинки КЖ, повреждение растений на делянках, обработанных *B. thuringiensis* В-5351, также было наименьшим в обоих сезонах.

Как и следовало ожидать, интенсивная дефолиация растений вследствие поедания их личинками и имаго колорадского жука приводила к формированию большого количества мелких клубней, как ранее наблюдали в случае использования химических инсектицидов против КЖ [17]. Обработка растений суспензией клеток бактерий обоих штаммов приводила к изменению структуры урожая картофеля, снижая массу мелких клубней как в 2020, так и 2021 вегетационном сезонах. Наиболее заметно это было на участках, обработанных суспензией клеток штамма *B. thuringiensis*

Таблица 2. Влияние обработки растений картофеля бактериями *B. thuringiensis* на плотность популяции колорадского жука (КЖ) в вегетационные сезоны 2020 и 2021 гг.

Показатель, шт./растение	Дата отбора	H ₂ O	<i>B. th.</i> В-5689	<i>B. th.</i> В-5351
2020 г.				
Яйца	17.06	4.61 ± 1.34a	4.60 ± 1.98a	3.81 ± 2.11a
	24.06	17.4 ± 7.2a	10.32 ± 4.84a	5.02 ± 2.90b
	04.07	4.32 ± 0.98a	2.10 ± 0.54b	1.80 ± 0.34b
	18.07	0.28 ± 0.04a	0.35 ± 0.02a	0.11 ± 0.02b
Кладки	17.06	0.73 ± 0.21a	0.47 ± 0.06a	0.32 ± 0.07a
	24.06	1.35 ± 0.06a	0.82 ± 0.11b	0.40 ± 0.06c
	04.07	0.17 ± 0.01a	0.11 ± 0.02a	0.11 ± 0.03a
	18.07	0.53 ± 0.07a	0.45 ± 0.1a	0.72 ± 0.07a
Имаго	17.06	1.57 ± 0.34a	1.28 ± 0.01a	0.91 ± 0.01b
	24.06	2.62 ± 0.92a	2.72 ± 1.01a	0.73 ± 0.04b
	04.07	0.02 ± 0.01a	0.02 ± 0.003a	0.02 ± 0.01a
	18.07	0.72 ± 0.03a	0.21 ± 0.03b	0.20 ± 0.08b
Личинки I возраста	17.06	0.01 ± 0.04a	0.03 ± 0.007a	0.01 ± 0.04a
	24.06	1.58 ± 0.75a	1.47 ± 0.14a	1.83 ± 0.50a
	04.07	8.59 ± 2.55a	7.34 ± 3.46a	4.65 ± 2.75b
	18.07	0.12 ± 0.03a	0.18 ± 0.03a	0.12 ± 0.04a
Личинки II возраста	17.06	0a	0a	0a
	24.06	9.00 ± 2.63a	6.31 ± 1.14a	1.05 ± 0.07c
	04.07	2.63 ± 1.61a	5.40 ± 0.51b	1.33 ± 1.25c
	18.07	0.41 ± 0.04a	0.55 ± 0.03a	1.33 ± 0.74b
Личинки III возраста	17.06	0a	0a	0a
	24.06	3.40 ± 1.03a	2.11 ± 0.92a	0.23 ± 0.52b
	04.07	12.75 ± 1.81a	5.2 ± 0.64b	0.91 ± 0.14c
	18.07	5.33 ± 3.63a	2.21 ± 1.8a	0.12 ± 0.04b
Личинки IV возраста	17.06	0a	0a	0a
	24.06	0a	0a	0a
	04.07	3.21 ± 2.07a	2.13 ± 1.44a	0.11 ± 0.09b
	18.07	2.24 ± 1.07a	1.13 ± 1.04a	0.52 ± 0.08b
Доля поврежденной ботвы, %	17.06	0a	0a	0a
	24.06	2.9 ± 1.85a	1.80 ± 0.34a	1.30 ± 0.85a
	04.07	16.74 ± 5.45a	8.82 ± 3.40a	4.83 ± 0.67b
	18.07	37.71 ± 6.88a	28.51 ± 6.28b	13.21 ± 3.26c
2021 г.				
Яйца	26.06	5.61 ± 1.74a	4.82 ± 1.73a	4.80 ± 1.37a
	02.07	12.5 ± 3.4a	6.44 ± 3.62a	5.71 ± 2.21a
	24.07	3.35 ± 1.29a	6.10 ± 1.68a	1.16 ± 0.13b
	03.08	0.22 ± 0.17a	0.10 ± 0.02a	0.11 ± 0.03a
Кладки	26.06	1.66 ± 0.21a	0.72 ± 0.06b	0.34 ± 0.07c
	02.07	0.28 ± 0.06a	0.22 ± 0.11a	0.13 ± 0.06a
	24.07	0.12 ± 0.03a	0.12 ± 0.03a	0.12 ± 0.03a
	03.08	0.81 ± 0.07a	0.64 ± 0.1a	0.60 ± 0.8a

Таблица 2. Окончание

Показатель, шт./растение	Дата отбора	H ₂ O	<i>B. th.</i> В-5689	<i>B. th.</i> В-5351
Имаго	26.06	0.45 ± 0.02a	0.36 ± 0.01a	0.10 ± 0.01b
	02.07	0.36 ± 0.02a	0.37 ± 0.03a	0.10 ± 0.1b
	24.07	0.03 ± 0.007a	0.01 ± 0.003a	0.03 ± 0.005a
	03.08	0.23 ± 0.03a	0.16 ± 0.03a	0.17 ± 0.08a
Личинки I возраста	26.06	0.12 ± 0.02a	0.03 ± 0.016b	0.07 ± 0.018a
	02.07	7.80 ± 2.01a	4.21 ± 1.06b	1.52 ± 0.59c
	24.07	7.60 ± 1.29a	5.53 ± 2.16a	2.51 ± 1.58b
	03.08	0.22 ± 0.05a	0.22 ± 0.05a	0.30 ± 0.08a
Личинки II возраста	26.06	0a	0a	0a
	02.07	0.81 ± 0.3a	0.10 ± 0.01b	0.05 ± 0.05b
	24.07	4.12 ± 1.26a	2.00 ± 0.51b	2.10 ± 0.78b
	03.08	0.46 ± 0.02a	0.33 ± 0.04b	0.21 ± 0.04b
Личинки III возраста	26.06	0a	0a	0a
	02.07	0a	0a	0a
	24.07	5.90 ± 1.80a	6.28 ± 0.64a	2.52 ± 1.25b
	03.08	0.51 ± 0.01a	0.27 ± 0.01b	0.11 ± 0.01b
Личинки IV возраста	26.06	0a	0a	0a
	02.07	0a	0a	0a
	24.07	0.46 ± 0.11a	0.55 ± 0.21a	0b
	03.08	0.85 ± 0.34a	0.7 ± 0.37a	0.50 ± 0.22b
Доля поврежденной ботвы, %	26.06	0a	0a	0a
	02.07	1.00 ± 0.44a	1.53 ± 0.82a	1.33 ± 0.81a
	24.07	18.8 ± 3.8a	6.71 ± 2.25b	11.6 ± 2.71b
	03.08	36.6 ± 9.9a	18.6 ± 4.0b	12.0 ± 3.56c

В-5351. В этом случае увеличивалась общая урожайность и масса крупных клубней (≥ 80 г), собранных на участке в 2-х сезонах. Соответственно, можно полагать, что эндофитность штамма

B. thuringiensis В-5351 в надземных органах растений картофеля позволила реализовать его защитный инсектицидный потенциал в отношении КЖ, в отличие от *B. thuringiensis* В-5689.

Таблица 3. Влияние обработок бактериями *B. thuringiensis* на урожайность картофеля в вегетационные сезоны 2020 и 2021 гг.

Масса клубней с деланки, г	Фракции клубней	H ₂ O	<i>B. th.</i> В-5689	<i>B. th.</i> В-5351
	>80 г	11 600 ± 1540a	13 600 ± 3220a	20 800 ± 4430b
50–80 г	8020 ± 596a	9850 ± 1000b	10 600 ± 1240b	
<50 г	1670 ± 586a	810 ± 215b	1020 ± 124b	
Урожайность, ц/га		234 ± 30a	235 ± 20a	317 ± 25b
2021 г.				
Масса клубней с деланки, г г	>80 г	6720 ± 1010a	10800 ± 798b	18300 ± 1380c
	50–80 г	6190 ± 800a	9800 ± 362b	8870 ± 900b
	<50 г	2500 ± 346a	793 ± 68b	1020 ± 3b
Урожайность, ц/га		250 ± 196a	276 ± 25a	318 ± 23c

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

B. thuringiensis В-5351, заселяющий поверхность и внутренние ткани побегов картофеля, несмотря на меньшую инсектицидную активность, реализовал высокий биологический потенциал в качестве агента биоконтроля колорадского жука, вероятно, за счет длительного присутствия в надземной части растения, где осуществлялся контакт с вредителем, и защищенности от воздействия окружающей среды в качестве эндофита, в то время как штамм *B. thuringiensis* В-5689, проявлявший высокую инсектицидную активность против колорадского жука в лабораторных условиях и в малой степени заселяющий побеги картофеля, не оказал значительного влияния на урожайность и популяцию вредителя в полевых условиях. Таким образом, отправной точкой при поиске высокоэффективных штаммов бактерий для использования в сельском хозяйстве может быть тестирование их способности к эндофитному существованию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clements J., Olson J.M., Sanchez-Sedillo B., Bradford B., Groves R.L. Changes in emergence phenology, fatty acid composition, and xenobiotic metabolizing enzyme expression is associated with increased insecticide resistance in the Colorado potato beetle // Arch. Insect Biochem. Physiol. 2020. V. 103. e21630. <https://doi.org/10.1002/arch.21630>
2. Benkovskaya G.V., Udalov M.B., Chusnutdinova E.K. Change in the polymorphism level in populations of the Colorado potato beetle // Rus. J. Genet. Appl. Res. 2010. V. 1 (5). P. 390–395. <https://doi.org/10.1134/S2079059711050157>
3. Kitaev K.A., Mardanshin I.S., Surina E.V., Leontieva T.L., Udalov M.B., Benkovskaya G.V. Modeling genetic processes underlying the development of resistance to fipronil in the populations of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) // Rus. J. Genet. Appl. Res. 2017. V. 7. P. 36–45. <https://doi.org/10.1134/S2079059717010063>
4. Rondon S.I., Feldman M., Thompson A., Oppedisano T., Shrestha G. Identifying resistance to the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) in potato germplasm: Review update // Front. Agron. 2021. V. 3. e642189. <https://doi.org/10.3389/fagro.2021.642189>
5. Kadoić-Balaško M., Mikac K.M., Bažok R., Lemic D. Modern techniques in Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) control and resistance management: history review and future perspectives // Insects. 2020. V. 11. P. 581–593. <https://doi.org/10.3390/insects11090581>
6. Jouzani G.S., Valijanian E., Sharafi R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 101 (7). P. 2691–2711. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8175-y>
7. Güney G., Cedden D., Hänniger S., Heckel D.G., Coutu C., Hegedus D.D., Mutlu D.A., Suludere Z., Sezen K., Güney E., Toprak U. Silencing of an ABC transporter, but not a cadherin, decreases the susceptibility of Colorado potato beetle larvae to *Bacillus thuringiensis* ssp. tenebrionis Cry3Aa toxin // Arch. Insect Biochem. Physiol. 2021. V. 108 (2). e21834. <https://doi.org/10.1002/arch.21834>
8. Jalali E., Maghsoudi S., Noroozian E. Ultraviolet protection of *Bacillus thuringiensis* through microencapsulation with Pickering emulsion method // Sci. Rep. 2020. V. 10. e20633. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77721-8>
9. de Almeida J.R., Bonatelli M.L., Batista B.D., Teixeira-Silva N.S., Mondin M., dos Santos R.C., Bento J.M.S., de Almeida Hayashibara C.A., Azevedo J.L., Quecine M.C. *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9, a tropical plant growth-promoting rhizobacterium, colonizes maize endophytically and alters the plant's production of volatile organic compounds during co-inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 // Environ. Microbiol. Rep. 2021. V. 13. P. 812–821. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13004>
10. Максимов И.В., Максимова Т.И., Сарварова Е.Р., Благова Д.К. Эндофитные бактерии как агенты для биопестицидов нового поколения // Прикл. биохим. и микробиол. 2018. Т. 54. № 2. С. 134–148. <https://doi.org/10.7868/S0555109918020034>
11. Sorokan A., Benkovskaya G., Burkhanova G., Blagov, D., Maksimov I. Endophytic strain *Bacillus subtilis* 26DCryChS producing Cry11a toxin from *Bacillus thuringiensis* promotes multifaceted potato defense against *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and pest *Leptinotarsa decemlineata* Say // Plants. 2020. V. 9. e1115. <https://doi.org/10.3390/plants9091115>
12. Онина С.А., Козлова Г.Г., Минина Н.Н., Панчихина Е.В., Усманов С.М. Исследование аналитических показателей почвы города Бирска и Бирского района Республики Башкортостан // Усп. совр. естествознания. 2018. № 6. С. 13–18.
13. Gassmann A.J. Resistance to Bt maize by western corn rootworm: effects of pest biology, the pest-crop interaction and the agricultural landscape on resistance // Insects. 2021. V. 12. A. 136. <https://doi.org/10.3390/insects12020136>
14. García-Suárez R., Verduzco-Rosas L.A., Ibarra J.E. Isolation and characterization of two highly insecticidal, endophytic strains of *Bacillus thuringiensis* // FEMS Microbiol. Ecol. 2021. V. 97. fiab080. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab080>
15. Kandel S.L., Joubert P.M., Doty S.L. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants // Microorganisms. 2017. V. 25. P. 77–91. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040077>
16. Azizoglu U. *Bacillus thuringiensis* as a biofertilizer and biostimulator: a mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of Bt // Curr. Microbiol. 2019. V. 76. P. 1379–1385. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01705-9>
17. Laznik Ž., Tóth T., Lakatos T. Control of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* [Say]) on potato under field conditions: a comparison of the effica-

cy of foliar application of two strains of *Steinernema feltiae* (Filipjev) and spraying with thiametoxam // J. Plant Dis. Prot. 2010. V. 117. P. 129–135. <https://doi.org/10.1007/BF03356348>

18. Maltsev S.V. Efficiency of ethylene application on seed potato tubers // Sel'skokhozyaistvennaya Biol. 2021. V. 56. P. 44–53. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.1.44eng>

Endophytic Strains of *Bacillus thuringiensis* for the Development of Means to Control the Number of the Colorado Potato Beetle in Potato Crops

A. V. Sorokan^{a, #}, G. V. Benkovskaya^a, I. S. Mardanshin^b, V. Yu. Alekseev^a, S. D. Rumyantsev^a, and I. V. Maksimov^a

^a*Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the RAS prosp. Oktyabrya 71, Ufa 450054, Russia*

^b*Bashkir Institute of Agriculture – Subdivision of the Ufa Federal Research Center of the RAS ul. Richarda Sorge 19, Ufa 450059, Russia*

[#]*E-mail: fouryanns@googlemail.com*

Currently, the search for *B. thuringiensis* strains to be used as biological control agents is based on their toxicity to insects in laboratory tests. At the same time, a number of strains of these bacteria are able to exist in symbiotic relationships with host plants, including being endophytes. The ability of *B. thuringiensis* strains to penetrate into the internal tissues of plants was evaluated by counting colony-forming units (CFU) of microorganisms 7 days after inoculation of sterile potato plants in test tubes; insecticidal activity was tested on larvae of the 3rd age obtained from overwintered adults of the Colorado beetle collected from fields in the Chishminsky and Iglinsky districts of Bashkortostan. It was shown that the strain of *B. thuringiensis* B-5351, which inhabits the surface ($50.01 \pm 8.10 \text{ CFU} \times 10^5/\text{g}$) and internal tissues ($38.92 \pm 9.62 \text{ CFU} \times 10^5/\text{g}$) of plant shoots, but has less insecticidal activity than the strain B. thuringiensis B-5689, which exhibits high insecticidal activity and colonizes mainly plant roots ($25.37 \pm 3.82 \text{ CFU} \times 10^5/\text{g}$), reduced colonization of potato crops by the Colorado potato beetle, and also increased the yield of tubers in a 2-year experiment (2020–2021). Under the influence of *B. thuringiensis* B-5351, a decrease in the number of larvae of early age was observed, in contrast to *B. thuringiensis* B-5689, which caused longer metamorphosis processes. Apparently, the effect of *B. thuringiensis* B-5351 was the death of insects. It is important that processing *B. thuringiensis* B-5351 contributed to a significant decrease in the number of late-instar larvae on crops treated with this strain, as well as the degree of defoliation of plants by the pest, which was not observed with the action of *B. thuringiensis* B-5689. On plots treated with *B. thuringiensis* B-5351, the yield of commercial tubers and the total yield increased. A method is proposed for studying the endophytic potential of strains in relation to the terrestrial part of plants to search for biocontrol agents as a basis for creating algorithms for constructing microbiomes in agrocenoses.

Keywords: Leptinotarsa decemlineata, Solanum tuberosum, Bacillus thuringiensis, biocontrol, yield.