

УДК: 632.9

Разработка биопестицидов против колорадского жука

А. П. Добрица, Н. Г. Корецкая, В. И. Гайтан, Л. В. Коломбет,
В. В. Дербышев, С. К. Жиглецова

АНАТОЛИЙ ПАВЛОВИЧ ДОБРИЦА — кандидат биологических наук, заведующий лабораторией генетики бактерий Государственного научного центра прикладной микробиологии (ГНЦПМ). Область научных интересов: механизмы стабильности и пластичности генома бактерий, прикладные аспекты генетики и генетической инженерии, биологические методы защиты растений.

НИНА ГЕОРГИЕВНА КОРЕЦКАЯ — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики бактерий ГНЦПМ. Область научных интересов: генетика и молекулярная биология бактериофагов, генетическая модификация микроорганизмов.

ВЕРА ИЛЬИНИЧНА ГАЙТАН — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории генетики бактерий ГНЦПМ. Область научных интересов: экологическая микробиология, биопестициды.

ЛЮБОВЬ ВАСИЛЬЕВНА КОЛОМБЕТ — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела микробиологических средств защиты растений ГНЦПМ. Область научных интересов: микроорганизмы и их метаболиты как средства биологического контроля в защите растений.

ВИКТОР ВИКТОРОВИЧ ДЕРБЫШЕВ — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии ГНЦПМ. Область научных интересов: моделирование процессов роста культур микроорганизмов, оптимизация условий ферментации природных и генетически измененных штаммов микроорганизмов.

СВЕТЛАНА КОНСТАНТИНОВНА ЖИГЛЕЦОВА — кандидат химических наук, старший научный сотрудник отдела экологической микробиологии ГНЦПМ. Область научных интересов: стабилизация и увеличение эффективности действия рецептур препаратов на основе живых и убитых клеток микроорганизмов.

142279 Оболенск, Московская область, ГНЦ прикладной микробиологии, тел. (0967)36-00-01,
E-mail info@nrciam.serpukhov.su

Одной из основных продовольственных сельскохозяйственных культур в России является картофель, и борьба с колорадским жуком, способным в ряде случаев полностью уничтожить листовую покров картофеля и других пасленовых и привести к полной или значительной потере урожая, относится к числу наиболее важных задач защиты растений в нашей стране. В рамках проекта МНТЦ № 0363 «Разработка биопестицидов нового поколения» нами проводились исследования, направленные на создание эффективных микробиологических средств контроля численности этого вредителя сельскохозяйственных культур.

Штаммы *Bacillus thuringiensis* как продуценты энтомотоксинов

При разработке систем интегрированной защиты растений, обеспечивающих высокий выход высококачественной и экологически чистой сельскохозяйственной продукции, особое внимание уделяется методам биологического контроля численности насекомых. Одними из наиболее эффективных и широко применяемых (около 90—95% рынка биопестицидов) средств борьбы с вредными насекомыми являются препараты на основе грам-

положительной спорообразующей бактерии *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), обладающей способностью формировать при споруляции параспоральные (локализованные рядом со спорой) кристаллические включения белковой природы [1].

Кристаллические белки, или δ -эндотоксины, подразделяемые на два мультигенных семейства — Cry- и Cyt-белки [2], и обуславливают, главным образом, инсектицидную активность *Bt*, хотя многие штаммы этой бактерии продуцируют и другие факторы активности в отношении насекомых. Из них наиболее заметное влияние на активность оказывает термостабильный β -экзотоксин, токсичный для насекомых, устойчивых к кристаллическим белкам *Bt* [3]. Определенный вклад в вирулентность могут вносить также фосфолипазы, протеазы, хитиназы и так называемые VIP-токсины — белки, секретируемые во время фазы вегетативного роста клеток *Bt* [4—6]. С момента первого описания (в 1901 г.) бактерии, которая может быть отнесена к *Bt* [7], из различных природных источников, включая почву, насекомых, листья и хвою растений, выделены тысячи природных изолятов этой бактерии [8—13], различающихся по физиологическим, морфологическим и серологическим (воздействие на антитела) характеристикам.

Разнообразие штаммов *Bt*, очевидно, обусловлено возможностью переноса их генов как путем трансдукции при фаговом заражении [14], так и в результате конъюгации [15]. Высокая эффективность передачи ряда конъюгативных плазмид *Bt* продемонстрирована не только при совместном культивировании штаммов этой бактерии на твердых или жидких средах в лабораторных условиях, но и в почве и личинках насекомых [16]. Штаммы *Bt* могут обмениваться генетическим материалом и с другими бактериями как близкородственными (*B. cereus*, *B. anthracis*), так и генетически более удаленными (*B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. Sphaericus* и др.) [17]. Генетическая пластичность *Bt* связана также с наличием в ее геноме разнообразных транслоцируемых генетических элементов — транспозонов и IS-элементов [18]. Следует отметить, что в подавляющем большинстве случаев детерминанты кристаллического белка являются плазмидными генами и могут также входить в состав транспозонов [19, 20].

Различные штаммы *Bt* (часто даже из одного сероварианта) значительно отличаются по спектру инсектицидного действия и токсичности продуцируемого ими кристаллического белка. Это связано как с большим разнообразием δ -эндотоксинов, синтезируемых разными штаммами *Bt*, так и с продукцией в клетках одного штамма параспоральных включений, содержащих несколько различных инсектицидных белков [21, 22].

Существовавшая до 1998 г. классификация δ -эндотоксинов *Bt* основана главным образом на специфичности их действия [23]. Согласно этой классификации δ -эндотоксины подразделяются на четыре группы: CryI — токсичные для личинок насекомых отряда Lepidoptera; CryII — токсичные для личинок насекомых двух таксонов Lepidoptera и Diptera; CryIII — токсичные для личинок Coleoptera; CryIV — токсичные для личинок Diptera. Но, как оказалось, эта система не может описать все разнообразие δ -эндотоксинов *Bt*, поэтому была предложена новая система каталогизации пестицидных белков *Bt*, основанная на степени их эволюционной дивергенции [2]. Следует подчеркнуть, что авторы новой классификации предпочитают называть δ -эндотоксины *Bt* пестицидными, а не инсектицидными белками, так как описаны несколько кристаллических белков *Bt*, активных в отношении вредителей, не являющихся насекомыми [1].

Пестицидные белки, входящие в состав кристаллических включений *Bt*, являются протоксинами. Механизм их действия включает растворение кристаллов в кишечнике насекомых, протеолитическое расщепление протоксинов до токсинов, связывание токсинов со специфическими рецепторами и формирование ими пор в мембранах клеток кишечника, что может приводить либо к нарушению клеточного гомеостаза, либо к лизису клеток и разрушению эпителия кишечника насекомых [24, 25].

δ -Эндотоксины растворимы в водно-щелочных средах при pH > 0 и водно-кислых средах при pH < 3. Щелочные условия в кишечнике насекомых отряда Lepidoptera способствуют растворению кристаллических белков [26]. В кишечнике насекомых отряда Coleoptera, чувствительных к Cry3A-белку, pH составляет 4—5 [27, 28]. Очевидно существуют дополнительные условия, способствующие растворению этого токсина в кишечнике колорадского жука и других жесткокрылых.

Преимуществами биопестицидов на основе *Bt* по сравнению с химическими инсектицидами являются отсутствие загрязняющих остатков, высокая специфичность действия, обуславливающая их безопасность для нецелевых организмов, и сравнительно низкая стоимость процедур, требуемых для регистрации их в качестве средств защиты растений [29, 30]. Вместе с тем они имеют ряд недостатков, в частности, сравнительно узкий спектр действия, слишком короткое время жизни, высокую стоимость, что не позволяет им стать полноценной альтернативой химическим агентам борьбы с насекомыми. Для преодоления указанных недостатков используются различные подходы. Так, например, уменьшение стоимости производства биопестицидов может быть достигнуто и достигается за счет оптимизации условий выращивания бактерий и использования более дешевых питательных сред. Для увеличения времени действия инсектицидных белков *Bt* в состав рецептур вводят специальные добавки. Клеточная стенка также может служить фактором защиты δ -эндотоксинов от инактивации при использовании в качестве их продуцентов неспорогенных (утративших способность образовывать споры) вариантов *Bt* или рекомбинантных штаммов с *cry*-генами, полученных на основе неспорогенных бактерий [31, 32]. Для повышения эффективности действия и/или расширения спектра пестицидной активности конструируют штаммы *Bt*, содержащие определенные комбинации детерминантов кристаллических белков [33]. Усиление активности некоторых сочетаний токсинов *Bt* достигается за счет синергетического эффекта [34, 35]. В ряде случаев активность штамма *Bt* против насекомых-мишеней может быть повышена в результате увеличения продукции специфического токсина за счет элиминации из бактериального генома детерминантов балластных кристаллических белков или в результате увеличения эффективности экспрессии гена δ -эндотоксина путем изменения его дозы, замены промоторов и т. д. [36—39].

Некоторые из этих подходов были использованы нами для конструирования рекомбинантных штаммов — продуцентов энтомотоксинов против колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* и создания новых препаратов на их основе.

Конструирование рекомбинантных штаммов *Bacillus thuringiensis*

В список микробиологических средств, рекомендуемых в России для борьбы с колорадским жуком, входит ряд препаратов на основе штаммов *Bt*. Действующим началом этих биопестицидов являются β -экзотоксин в препарате Битоксибациллин, производимом на основе штаммов *Bt* subsp. *thuringiensis*, и Coleoptera-специфический δ -эндотоксин (инсектицидный белок Cry3A-типа) в препаратах Новодор, Децимид и Колорадо, получаемых на основе штаммов *Bt* subsp. *morrisoni*. Механизмы действия Cry3A-белка и β -экзотоксина совершенно различные, и можно было предположить, что штамм, способный синтезировать оба этих токсина, должен превосходить известные штаммы *Bt* по активности против колорадского жука и вероятности появления резистентных популяций этого вредителя.

Для конструирования такого штамма нами был клонирован ген *cry3A*, который был затем субклонирован

Таблица 1

Рекомбинантные штаммы *Bacillus thuringiensis*, активные против жесткокрылых

| Штамм | Продуцируемые энтомотоксины | Специфичность δ-эндотоксинов* |
|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| subsp. <i>thuringiensis</i> IPM-37 | Exo; Cry3A | Coleoptera |
| subsp. <i>thuringiensis</i> 98-I | Exo; Cry1Ab; Cry1Ac | Lepidoptera |
| subsp. <i>kurstaki</i> IPM-46 | Cry1Ac; Cry3A | Lepidoptera; Coleoptera |
| subsp. <i>thuringiensis</i> 98-II | Exo; Cry1Ab; Cry1Ac; Cry3A | Lepidoptera; Coleoptera |

* Против каких групп насекомых δ-эндотоксин активен.

Таблица 2

Инсектицидная активность рекомбинантных и производственных штаммов *Bacillus thuringiensis* против личинок колорадского жука

| Штамм | Инсектицидная активность ЛК ₅₀ |
|---|---|
| subsp. <i>thuringiensis</i> IPM-37 (рекомбинантный штамм) | 0,21% КЖ* |
| subsp. <i>Tenebrionis</i> (продуцент Новодора) | 0,86% КЖ |
| subsp. <i>thuringiensis</i> 98 (продуцент Битоксибациллина) | 0,82% КЖ |

* КЖ — культуральная жидкость.

в составе транспозона Tn917cat и после транслокации транспозона Tn917-cry3A в конъюгативную плазмиду в клетках *Bt* subsp. *morrisoni* DC передан путем конъюгации в клетки полученного нами ранее некристаллогенного варианта штамма *Bt* subsp. *Thuringiensis* 98 — производственного штамма-продуцента Битоксибациллина [40]. Синтезированный штамм обозначен нами как subsp. *thuringiensis* IPM-37 (табл. 1). Результаты определения инсектицидной активности этого штамма (табл. 2) свидетельствуют, что она в 3,5—4 раза выше активности штаммов — продуцентов Новодора и Битоксибациллина, очевидно, благодаря синергетическому эффекту действия двух энтомотоксинов, синтезируемых IPM-37.

Препарат Битоксибациллин часто используется для борьбы не только с колорадским жуком, но и чешуекрылыми вредителями растений. Штаммы, на основе которых производят этот биопестицид, синтезируют только один Lepidoptera-специфический белок (Cry1Ab), имеющий сравнительно узкий спектр действия. Для увеличения инсектицидной активности создаваемых препаратов

— аналогов Битоксибациллина в клетки его продуцента *Bt* subsp. *thuringiensis* 98 была перенесена cry-плазида *Bt* subsp. *kurstaki* HD-73. Полученный рекомбинантный штамм (98-I) продуцирует δ-эндотоксины Cry1Ab и Cry1Ac, суммарное действие которых обеспечивает более широкий по сравнению с производственными штаммами спектр активности этого штамма против чешуекрылых насекомых.

Трансформация клеток *Bt* subsp. *kurstaki* HD-73 ДНК плазмиды pTV241 [40], несущей ген cry3A, позволила получить штамм, обозначенный нами как IPM-46 — продуцент Lepidoptera- и Coleoptera-специфических белков. Хотя уровень продукции Coleoptera-специфического белка Cry3A в этом штамме ниже, чем в штамме-продуценте препарата Новодор, активность рекомбинантного штамма против колорадского жука значительно выше, чем активность производственного штамма: их величины ЛК₅₀ различаются в шесть раз (см. табл. 3). В штамме IPM-46 присутствие Cry3A не влияет на активность Cry1A против чешуекрылых. В то же время Cry1A усиливает активность Cry3A. Механизм усиле-

Таблица 3

Продукция δ-эндотоксинов и инсектицидная активность штаммов *Bacillus thuringiensis* против личинок колорадского жука

| Штамм | Концентрация δ-эндотоксина, мг/мл | | Инсектицидная активность (ЛК ₅₀), споры/мл |
|-------------------------------|-----------------------------------|-------|--|
| | Cry3A | CryAc | |
| subsp. <i>kurstaki</i> HD-73 | — | 0,6 | — |
| var. <i>tenebrionis</i> 1516 | 1,3 | — | 6,1·10 ⁶ |
| subsp. <i>kurstaki</i> IPM-46 | 0,9 | 0,9 | 1,0·10 ⁶ |

ния Coleoptera-специфической активности Cry3A-белка в присутствии Lepidoptera-специфического Cry1A-токсина пока не ясен. Можно лишь предположить, что позитивный эффект влияния Cry1A на токсичность Cry3A является следствием межмолекулярных взаимодействий этих белков при формировании поры в клеточной мембране кишечника личинок колорадского жука. При этом Cry3A обеспечивает, по-видимому, связывание с рецепторами, а Cry1A — собственно порообразование. Если также предположить, что значительно более низкий уровень инсектицидной активности Cry3A, чем многих других инсектицидных белков *Bt*, в том числе и Cry1A, связан в основном с его низкой пороформирующей способностью, то эти два допущения позволяют объяснить, почему Cry1A усиливает активность Cry3A, а Cry3A не влияет на токсичность Cry1A.

В результате транслокации варианта транспозона, содержащего детерминант Cry3A-токсина, в геном конъюгативной плазмиды *Bt* subsp. *kurstaki* HD-73 и переноса модифицированной плазмиды в клетки *Bt* subsp. *thuringiensis* 98 сконструирован также рекомбинантный штамм (98-II), способный синтезировать β -экзотоксин и δ -эндотоксины Cry1Ab, Cry1Ac и Cry3A типов.

Конструирование продуцентов инкапсулированных биоинсектицидов

Конкуренцию штаммам *Bt* как продуцентам Cry-белков могут составить другие бактерии. Среди них наиболее перспективными считаются представители рода *Pseudomonas*. Их потенциальные преимущества — сравнительно небольшая продолжительность ферментации и дешевый питательный субстрат, снижающие себестоимость производства, и возможность получать на основе этих продуцентов так называемые инкапсулированные биопестициды с увеличенным в несколько раз временем эффективного действия [41]. Пролонгирование биологической активности в этом случае связано с тем, что в отличие от препаратов на основе споро-кристаллических комплексов *Bt*, где кристаллы белка находятся во внеклеточном состоянии, в этих биопестицидах δ -эндотоксин локализован внутри клеток и защищен от действия повреждающих факторов клеточной оболочкой. Такие препараты на основе убитых клеток превосходят биопестициды на основе *Bt* и по степени экологической безопасности. К недостаткам многих препаратов на основе *Bt* следует отнести загрязнение окружающей среды спорами.

Естественно, что указанные преимущества могут быть реализованы в полной степени только в том случае, если новые продуценты не будут уступать *Bt* по уровню синтеза δ -эндотоксина. Однако, как известно, использование генно-инженерных штаммов в производстве сталкивается с определенными трудностями из-за их высокой сегрегационной и структурной нестабильности в условиях эффективной экспрессии детерминанта целевого продукта. Клонирование чужеродных генов в составе векторов для регулируемой экспрессии позволяет контролировать процесс их экспрессии, делает возможным проведение ферментации в две стадии (стадия I — накопление клеточной биомассы, стадия II — синтез продукта клонированного гена) и, таким образом, значи-

тельно снижает отрицательные последствия сверхсинтеза целевого продукта, требующего максимальной мобилизации клеточных ресурсов.

Этот подход был применен нами для создания на основе почвенной грамотрицательной бактерии *Pseudomonas putida* альтернативного продуцента Cry3A-белка. Основой для конструирования вектора для *cry3A*-гена служила плаزمида pNM185 [42], содержащая промотор Pm и ген *xylS* — элементы регуляции группы генов псевдомонадной TOL плазмиды pWVO, детерминирующих деградацию ароматических соединений [43]. Выбор системы Pm/*XylS* для контроля экспрессии *cry3A*-гена обусловлен тем, что она может быть индуцирована низкими концентрациями дешевых индукторов — различных бензоатов. Кроме того, система индукции и репликон pNM185 имеют широкий круг хозяев, и рекомбинантные плазмиды, сконструированные на ее основе, могут быть переданы в клетки бактерий различных родов, что существенно облегчает задачу создания новых продуцентов. Наличие в структуре pNM185 *mob*-генов позволяет осуществлять перенос этой плазмиды путем конъюгации, используя *tra*-систему плазмид группы IncPI.

На рис. 1 приведена карта сконструированной нами рекомбинантной плазмиды pBTN11, в которой экспрессия *cry3A*-гена находится под контролем системы Pm/*XylS*. Была осуществлена передача этой плазмиды в клетки *P. putida* BS1356 и показано, что в результате индукции 3-метилбензоатом уровень синтеза инсектицидного белка в клетках рекомбинантного штамма, обозначенного как IPM-36, может достигать 60% общего клеточного белка и в них формируются включения этого токсина.

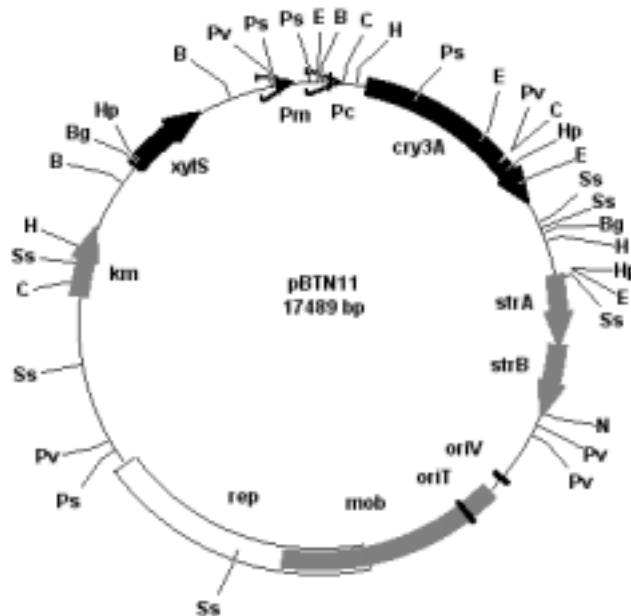


Рис. 1. Карта плазмиды pBTN11.

Сайты рестрикции: B - *Bam*HI, Bg - *Bgl*II, C - *Cl*aI, E - *Eco*RI, H - *Hind*III, Hp - *Hpa*I, N - *Not*I, Ps - *Pst*I, Pv - *Pvu*II, Ss - *Sst*I. Экспрессия *cry3A*-гена находится под контролем собственного промотора и двух гетерологических промоторов: Pm и Pс (промо-тор *cry1Ab*-гена). Репликон (rep) и *mob*-гены принадлежат плазмиде pNM185

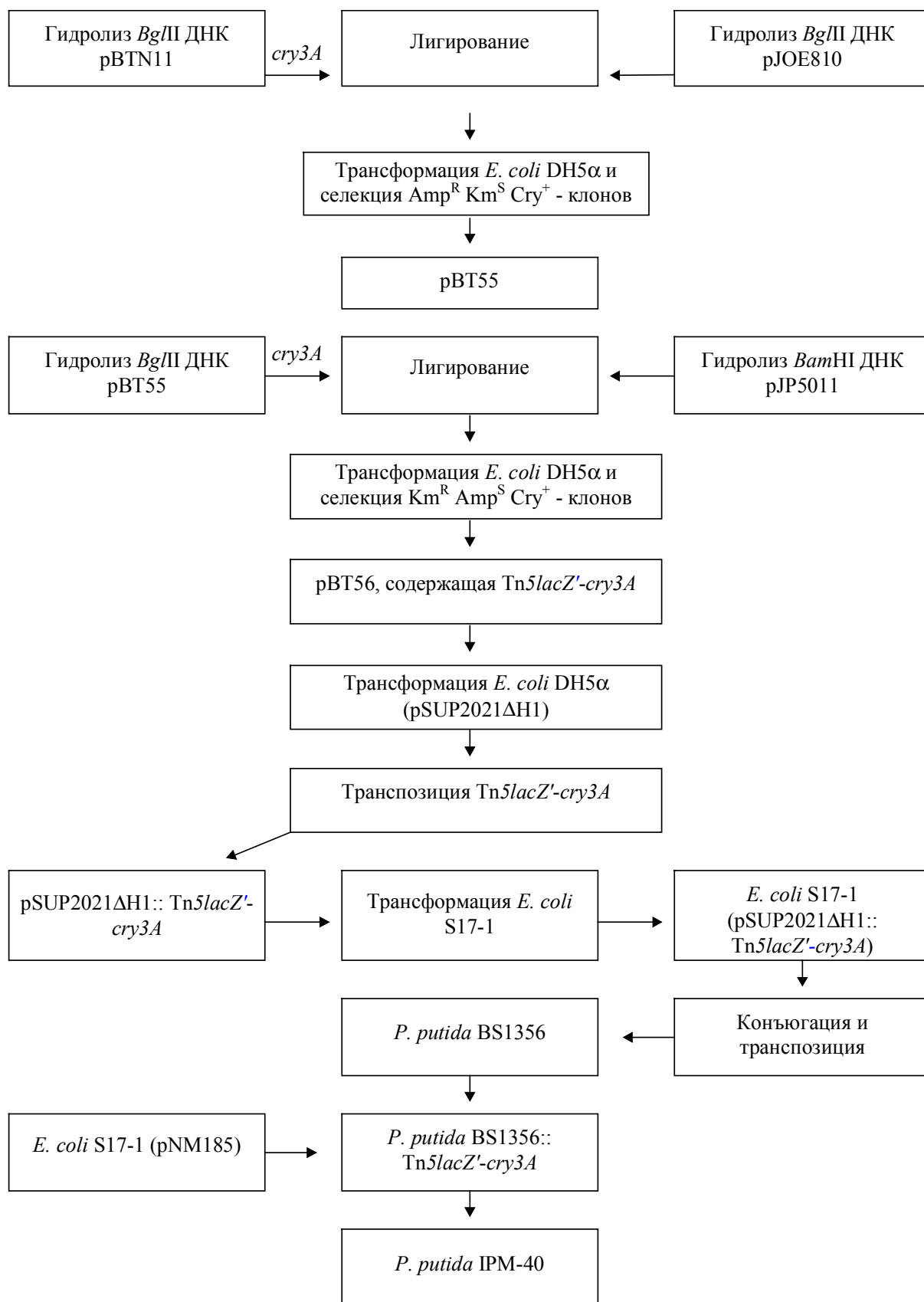


Рис. 2. Схема конструирования штамма *P. putida* IPM-40 с хромосомной локализацией *cry3A*-гена

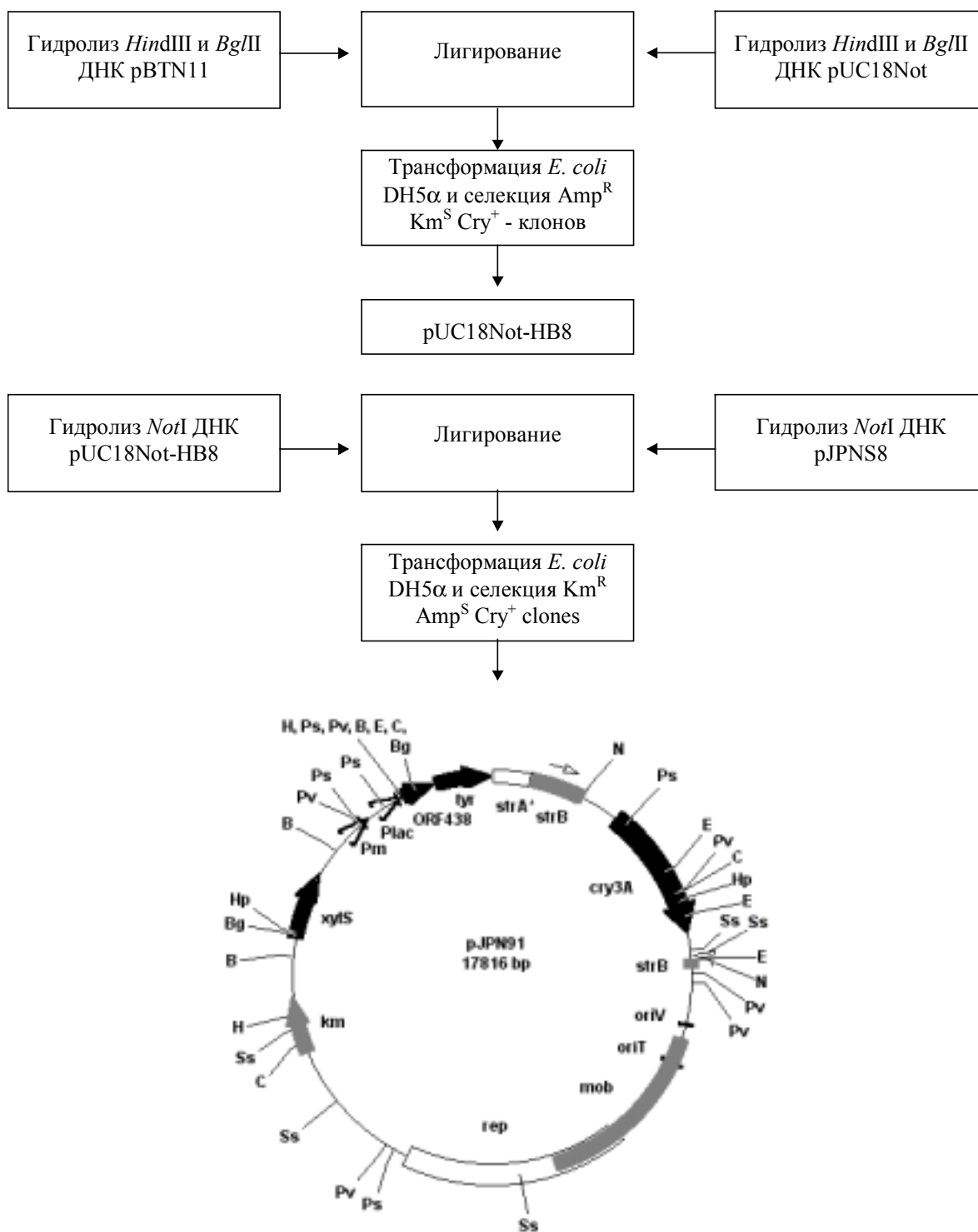


Рис. 3. Схема конструирования рекомбинантной плазмиды pJPN91, содержащей *cry3A* - ген *Bt var. tenebrionis* и гены синтеза меланина.

Сайты рестрикции обозначены, как на рис. 1

Скорость роста, стабильность и продуктивность штамма IPM-36 и полученных на его основе мутантных штаммов в условиях индукции экспрессии *cry3A*-гена.

Индуктор (3-метилбензоат натрия) добавляли в трехчасовую культуру

| Штамм | Удельная скорость роста (ч ⁻¹) | Стабильность | | Продуктивность | | |
|--------------------------|--|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------|----------------------------|------------------------------------|
| | | доля клонов, сохранивших плазмиду, % | доля мутантов ^{**} , % | общий белок, мг/мл | <i>cry3A</i> -белок, мг/мл | доля <i>Cry3A</i> в общем белке, % |
| IPM-36 — BS1356 (pBTN11) | 0,09 | 34 | 20 | 0,84 | 0,58 | 69 |
| N26pl (pBTN11) | 0,34 | 76 | <3 | 1,12 | 0,59 | 53 |
| N45pl (pBTN11) | 0,20 | 70 | 5 | 1,2 | 0,62 | 52 |
| N56pl (pBTN11) | 0,20 | 68 | <3 | 0,96 | 0,64 | 66,5 |
| N68pl (pBTN11) | 0,13 | 70 | 3 | 1,1 | 0,68 | 64 |
| BS1356 (pBTN11-72) | 0,44 | 88 | <3 | 1,0 | 0,41 | 41 |

* В первые два часа после добавления индуктора.

** Доля Ind⁻ (не способных к индуцированному синтезу *Cry 3A* белка) мутантов среди клонов с плазмидой.

К сожалению, индукция экспрессии гена δ -эндотоксина в клетках этого штамма наиболее эффективна на ранних стадиях ферментации, на которых негативное влияние целевого белка на жизнеспособность и скорость роста культуры также максимальны.

С целью оптимизации свойств штамма IPM-36 как продуцента инсектицидного белка были исследованы клоны, имеющие более высокую, чем у исходного штамма, скорость роста на среде с индуктором. Полученные клоны различаются не только скоростью роста и локализацией мутации (в плазмиде pBTN11, содержащей *cry3A*-ген, или хромосоме), но и уровнем индуцированного синтеза δ -эндотоксина. При этом большинство мутантов теряет способность к высокому индуцированному синтезу *Cry3A* белка. В то же время удалось отобрать несколько мутантов штамма IPM-36, значительно превосходящих исходный штамм по структурной и сегрегационной стабильности, которые не утрачивают его способности обеспечивать высокий выход токсина в условиях индукции (табл. 4).

С целью получения высокостабильных продуцентов инкапсулированного инсектицидного белка был сконструирован также штамм *P. putida* IPM-40 (рис. 2), в котором промотор Pm и находящийся под его контролем *cry3A*-ген встроены в хромосому реципиентного штамма *P. putida* BS1356, а регуляторный *hylS*-ген входит в состав плазмиды pNM185. При конструировании штамма использовались плазмиды rJOE810 [44], rJP5011 [45] и pSUP2021 Δ H1 (получена в данной работе путем удаления *HindIII* фрагмента с большей частью Tn5 из плазмиды rSUP2021 [46]).

Для обеспечения большей защиты δ -эндотоксина в клетках псевдомонад от УФ света была получена векторная плазмида, способная поддерживать и детерминировать в широком круге хозяев синтез меланинового пигмента, и в составе этой плазмиды, обозначенной нами как rJPNS8, был клонирован ген *cry3A*. Плазмида rJPNS8 сконструирована путем объединения геномов pNM185 [42] и rJOE810 [44], частичного гидро-

лиза рекомбинантной плазмиды под действием эндонуклеазы *Sau3A* и циклизации в результате обработки ДНК-лигазой одного из образовавшихся фрагментов. Схема конструирования и карта рекомбинантной плазмиды с генами *mel* и *cry3A*, полученной на основе rJPNS8 и обозначенной как rJPN91, представлены на рис. 3. Плазмида rJPN91 была передана в клетки нескольких штаммов *Pseudomonas* spp. и проведены исследования зависимости уровня синтеза меланина в их клетках от условий культивирования.

Конструирование энтомопатогенов на основе почвенных бактерий — супрессоров фитопатогенных микроорганизмов

С целью создания агентов биологического контроля, способных действовать как против насекомых отр. Coleoptera, так и против бактериальных и/или грибных возбудителей болезней растений, был проведен скрининг коллекции ризосферных псевдомонад (630 изолятов) на активность по отношению к соответствующим фитопатогенам (табл. 5).

Из штаммов, входящих в коллекцию, около 65% в той или иной степени подавляют грибные патогены и только 15% ингибируют рост бактериальных возбудителей болезней. Около 5% изученных бактериальных изолятов обладают широкими спектрами антигрибной активности, подавляя 6—8 штаммов грибов-возбудителей болезней растений. Скрининг активности штаммов против бактериальных фитопатогенов показал, что только два изолята подавляют 7 штаммов бактерий-возбудителей болезней растений, примерно 5% исследованных псевдомонад ингибируют 4 бактериальных фитопатогена.

Поиск потенциальных агентов биологического контроля фитопатогенов проводили не только по супрессирующей (подавляющей жизнедеятельность) активности штаммов по отношению к возбудителям болезней, но и по присутствию в их клетках генетических детерминан-

Фитопатогенные микроорганизмы, использованные как мишени для скрининга ризосферных бактерий

| Микроорганизм | Вызываемая болезнь сельскохозяйственных растений | Источник получения |
|--|--|--|
| Бактерии | | |
| <i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>chrysanthemi</i> | Корневая гниль риса | Всероссийский институт фитопатологии |
| <i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> | Мягкая гниль картофеля | - ,, - |
| <i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> | Мягкая гниль капусты | - ,, - |
| <i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> | Черная ножка картофеля | Всероссийский институт картофельного хозяйства |
| <i>Pseudomonas solanacearum</i> | Бурая гниль или вилт картофеля | Кафедра биологии почв МГУ |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | Клубневая гниль картофеля | Всероссийский институт картофельного хозяйства |
| <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> | Бактериоз капусты | Всероссийский институт фитопатологии |
| <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i> | Ожог риса | - ,, - |
| Актиномицеты | | |
| <i>Streptomyces scabies</i> | Парша обыкновенная картофеля | Всероссийский институт картофельного хозяйства |
| Грибы | | |
| <i>Alternaria brassicae</i> | Альтернариоз картофеля | Всероссийский институт защиты растений |
| <i>Colletotrichum atramentarium</i> | Антракноз зерновых культур | - ,, - |
| <i>Fusarium culmorum</i> | Гнили клубней картофеля | - ,, - |
| <i>Fusarium graminearum</i> | То же | - ,, - |
| <i>Fusarium hematium</i> | Фузариоз корней овощебахчевых культур | - ,, - |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | Гнили клубней картофеля | - ,, - |
| <i>Fusarium solani</i> | Корневые гнили злаковых, гнили клубней картофеля | ГНЦ прикладной микробиологии |
| <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> (Ggt) | Офиоболезная гниль корней пшеницы | Университет штата Вашингтон, Пульман |
| <i>Oospora lactis</i> | Резиновая гниль картофеля | Всероссийский институт картофельного хозяйства |
| <i>Phoma exigua</i> | Фомозная гниль | - ,, - |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | Ризоктониоз картофеля и других культур | Всероссийский институт защиты растений |

тов синтеза вторичных метаболитов, обладающих антибиотической активностью [47]. При характеристике штаммов в коллекции ризосферных псевдомонад с помощью ДНК-ДНК гибридизации и полимеразной цепной реакции на наличие возможных продуцентов антибиотиков были выявлены четыре штамма-продуцента феназинов и шесть штаммов, содержащих гены, ответственные за синтез 2,4-диацил-тилфлороглюцина. Следует отметить, что эти штаммы либо не были активны по отношению к фитопатогенным микроорганизмам, использованным для тестирования коллекции, либо ингибировали рост сравнительно небольшого числа возбудителей болезней растений, что может указывать на наличие у наиболее активных штаммов коллекции каких-то иных механизмов супрессии фитопатогенов.

В клетки 24-х штаммов псевдомонад, обладающих супрессорной активностью в отношении широкого спектра бактериальных и грибных фитопатогенов, была передана плаزمид рBTN11. Полученные штаммы зна-

чительно различаются по уровню конститутивной (независимой от присутствия индуктора) продукции Cgr3A-белка (от 0,5 до 12% от общего белка). В отличие от штамма IPM-36, сконструированного на основе *P. putida* BS1356 и характеризующегося высоким уровнем индуцированного синтеза токсина (до 60 % общего клеточного белка), ни в одном из штаммов-супрессоров при их выращивании в присутствии 3-метилбензоата его продукция не превышает 10%.

Так как переданная плазмид детерминирует синтез Coleoptera-специфического инсектицидного белка, активного начала биопрепаратов, используемых в основном для защиты картофеля от колорадского жука, то наибольший интерес представляют рекомбинантные штаммы, совмещающие эту активность со способностью подавлять развитие возбудителей болезней именно этой важной сельскохозяйственной культуры. Из отобранных штаммов наиболее широким спектром активности в отношении возбудителей болезней картофе-

ля обладают штаммы P222, P285, P391, P399, P438, P442, P463 и P469. Сравнительная оценка антагонистической активности этих штаммов и сконструированных на их основе рекомбинантных штаммов в отношении бактериальных (*E. carotovora* pv. *carotovora*, *P. solanacearum* и *Pseudomonas* sp.) и грибных (*A. brassicae*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. solani*, *O. lactis*, *P. exigia*, *P. infestans*) патогенов картофеля показала, что генетически модифицированные и исходные штаммы практически не различаются по уровню и спектру ингибирующего действия на эти микроорганизмы. Наиболее перспективен штамм на основе P469, активный по отношению ко всем перечисленным выше фитопатогенам, включая возбудителя фитофтороза картофеля *P. infestans*. Рекомбинантный штамм, токсичный для колорадского жука, получен также на основе *P. fluorescens* H-16, уже используемого для производства биопрепаратов, стимулирующих рост растений. Конститутивная продукция энтомотоксина в этом штамме составляет 7 % общего клеточного белка.

Продуцирующие Cry3A-белок рекомбинантные штаммы были сконструированы также на основе штаммов *Bacillus* spp. (предоставленных департаментом энтомологии и фитопатологии Университета Теннесси, Ноксвилл). В частности, в клетки штамма *Bacillus cereus* BA55, способного колонизировать растения и супрессировать фитопатогенные микроорганизмы, путем конъюгации передан ген *Coleoptera*-специфического инсектицидного белка. На основе штамма *B. pasteurii* BA19, активного по отношению к фитопатогенному грибу *R. solani*, получены три рекомбинантных штамма, синтезирующих энтомотоксины. Один из штаммов продуцирует белок Cry3A, второй — Cry1Ac, в третьем штамме синтезируются на одинаково высоком уровне оба δ -эндотоксина — *Lepidoptera*-специфический инсектицидный белок Cry1Ac и активный против насекомых отр. *Coleoptera* δ -эндотоксин Cry3A-типа.

Разработка технологии производства биопрепаратов на основе генетически модифицированных штаммов-продуцентов энтомотоксинов

С целью разработки технологических схем производства биопестицидов на основе штаммов *P. putida* IPM-36 и *Bt* subsp. *thuringiensis* IPM-37 изучены условия выращивания этих культур, влияющие на выход энтомотоксинов. Эти исследования, в частности, выявили преимущество синтетической питательной среды для культивирования *P. putida* IPM-36 по сравнению со средами на основе белковых гидролизатов в плане сохранности плазмид в клетках и продукции δ -эндотоксина. При выращивании *P. putida* IPM-36 на синтетической среде выход δ -эндотоксина составляет 0,6—0,8 г/л в любой из двух альтернативных технологий, разработанных нами для получения клеточной биомассы с высоким содержанием этого белка. Первая технология использует возможность увеличения экспрессии *cry3A*-гена под воздействием индуктора, по второй — осуществляется синтез δ -эндотоксина в условиях подпитки культуры концентрированным сбалансированной питательной среды.

Для производства биоинсектицидов на основе штамма *B. thuringiensis* IPM-37 могут быть использованы уже существующие технологии, включая его культивирование на стандартной дрожже-полисахаридной среде,

применяемой на микробиологических предприятиях России и других стран СНГ для выращивания штаммов *Bt*. Главный недостаток дрожже-полисахаридной среды с точки зрения производства и применения микробиологических средств защиты растений связан с тем, что эта среда представляет собой неустойчивую суспензию с большим содержанием нерастворимых компонентов (дрожжевые клетки и кукурузная мука). Значительная часть этих компонентов остается неиспользованной и резко увеличивает долю балластных веществ в культуре и препаратах, повышая потери на стадии концентрирования и затрудняя распыление препаратов при обработке растений. Этот недостаток может быть устранен при использовании осветленной, содержащей только растворимые компоненты питательной среды.

В результате проведенных исследований были выбраны основные компоненты такой среды (источники азота и углерода) и компоненты, позитивно влияющие на продукцию δ -эндотоксина, и определены их концентрации, позволяющие достигать уровней продукции β -экзотоксина и δ -эндотоксина штаммом IPM-37 — 0,6 и 2,8 г/л, соответственно. Согласно результатам определения оптимального соотношения содержания β -экзотоксина и инсектицидного белка в препарате против колорадского жука оно должно составлять 1:4. Соотношение уровней продукции этих токсинов штаммом IPM-37 примерно соответствует данной величине и, следовательно, нет необходимости его изменять в большую или меньшую сторону.

Выявлен ряд реагентов, которые могут быть использованы для инактивации клеток *P. putida* IPM-36 при сохранении их инсектицидной активности, и веществ, которые могут рассматриваться как перспективные консерванты, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества, загустители и прилипатели при разработке жидких форм рецептур биоинсектицидов на основе этого штамма и *B. thuringiensis* IPM-37. Для препаратов на основе *P. putida* IPM-36 и *Bt* subsp. *thuringiensis* IPM-37 разработаны рецептуры двух типов: водный суспензионный концентрат и эмульсионная форма.

Проведенные мелкоделяночные испытания препаратов на основе рекомбинантных штаммов-продуцентов энтомотоксинов показали, что однократная обработка картофеля в период массового появления личинок колорадского жука биопестицидом на основе *Bt* subsp. *thuringiensis* IPM-37 при норме расхода 2,0—3,0 л/га обеспечивает существенное снижение численности личинок, числа поврежденных кустов и площади листовой поверхности. Валовая урожайность и выход товарной фракции при использовании этого биопрепарата практически такие же, как и в случае применения эталонного химического инсектицида Кинмикс.

Закключение

В результате проведенных исследований показано, что одним из путей решения проблемы создания эффективных и экологически чистых препаратов для борьбы с колорадским жуком является использование рекомбинантных штаммов на основе *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) и *Pseudomonas putida* в качестве продуцентов энтомотоксинов.

Сконструированные штаммы *Bt* значительно превосходят существующие производственные штаммы по эффективности действия против насекомых или обла-

дают более широким спектром действия. Отобранные мутанты созданного нами ранее штамма *P. putida* IPM-36 как штамма, который может быть использован для производства инкапсулированного биопестицида против колорадского жука, обладают большей, чем прототип, устойчивостью к суперпродукции δ -эндотоксина активного против личинок этого вредителя. На основе штаммов *Pseudomonas* spp. и *Bacillus* spp., супрессирующих рост и развитие широкого круга грибных и бактериальных фитопатогенов, получены бактерии, обладающие активностью как против возбудителей болезней растений, в том числе и картофеля, так и против колорадского жука. Технологии, разработанные для производства биопрепаратов на основе *P. putida* IPM-36 и *Bt* subsp. *thuringiensis* IPM-37, могут найти применение и при создании препаратов на основе других штаммов. Логическим продолжением наших исследований по изучению структуры и механизма действия инсектицидных белков [48—51], позволивших предложить принципиально новую модель их взаимодействия с клеточными мембранами [52], будут работы по белковой инженерии этих токсинов.

Наиболее готовы к практическому использованию следующие результаты работ по проекту:

— штамм *P. fluorescens* P469, активный против ряда фитопатогенных микроорганизмов, и сконструированный на его основе рекомбинантный штамм IPM-44, предлагаемые для создания препаратов комплексной защиты растений от болезней и вредных насекомых отряда Coleoptera;

— штамм *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* IPM-46, активный против насекомых отряда Lepidoptera и Coleoptera, предлагаемый для создания биоинсектицида широкого спектра действия;

— биопрепарат комбинированного действия для борьбы с колорадским жуком и другими жесткокрылыми насекомыми на основе рекомбинантного штамма *Bt* subsp. *thuringiensis* IPM-37, синтезирующего β -экзотоксин и Coleoptera-специфический δ -эндотоксин. Продукция этим штаммом двух токсинов с различными механизмами действия определяет более чем в три раза высокую активность его культур по сравнению с культурами других штаммов *Bt*, применяемых для борьбы с колорадским жуком. При использовании препаратов на основе штамма IPM-37 суммарное воздействие белкового и низкомолекулярного токсинов снижает также риск формирования популяций насекомых, устойчивых к биоинсектициду;

— инкапсулированный биоинсектицид на основе рекомбинантного штамма *P. putida* IPM-36 для защиты картофеля и других пасленовых от колорадского жука. Его преимущества — защита энтомотоксина от действия факторов внешней среды клеточной стенкой продуцента в связи с его внутриклеточной локализацией; уменьшение возможных отрицательных последствий для окружающей среды при использовании препаратов на основе инактивированных вегетативных клеток по сравнению с препаратами, содержащими кристаллы и споры *B. thuringiensis*; достаточно высокая продуктивность и технологичность при производстве.

Дальнейшие усилия будут направлены на завершение разработки технологических схем, опытно-промышленной технологии и на проведение токсикологической, гигиенической и экологической оценки и по-

следующих государственных испытаний этих биопестицидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Feitelson J.S., Payne J., Kim I. Bio/Technology, 1992, v. 10, p. 271—275.
2. Crickmore N., Zeigler D.R., Feitelson J., Schnepf E., van Rie J., Lereclus D., Baum J., Dean D.H. Mol. Biol. Rev., 1998, v. 62, 3, p. 807—813.
3. Levinson B.I. In: Analytical chemistry of *Bacillus thuringiensis*. Ed. by L. A. Hickle and W. L. Fitch. Washington, D. C., American Chemical Society, 1990, p. 115—136.
4. Zhang M.-J., Luvgren A., Low M. G., Landün R. Infect. Immun., 1993, v. 61, p. 4947—4954.
5. Luvgren A., Zhang M.-J., Engström A., Dalhammar G., Landün R. Mol. Microbiol., 1990, v. 4, p. 2137—2146.
6. Warren G.W., Koziel M.G., Mullins M.A., Nye G.J., Desai N., Carr B., Kostichka N.K. World Intellectual Property Organization patent WO 94/21795, 1994.
7. Ishivata S. Dainihon Sanshi Keiho, 1901, v. 9, p. 1—5.
8. Martin P.W.A., Travers R.S. Appl. Environ. Microbiol., 1989, v. 55, p. 2437—2442.
9. Smith R.A., Couche G.A. Appl. Environ. Microbiol., 1991, v. 57, p. 311—315.
10. Bernhard K., Jarrett P., Meadows M., Butt J., Ellis D.J., Roberts G.M., Pauli S., Rodgers P., Burgess D.J. Invertebr. Pathol., 1997, v. 70, p. 59—68.
11. Lecadet M.-M., Frachon E., Dumanoir V.C., Ripouteau H., Hamon S., Laurent P., Thiéry I. J. Appl. Microbiol., 1999, v. 86, p. 660—672.
12. de Barjac H., Frachon E. Entomophaga, 1990, v. 35, p. 233—240.
13. Jung K.B., Cote C. J. Appl. Microbiol., 2001, v. 90, 1, p. 115—152.
14. Ruhfel R. E., Robillard N. J., Thorne C. B. J. Bacteriol., 1984, v. 157, 3, p. 708—711.
15. González J., M., Jr., Brown B.J., Carlton B.C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, p. 6951—6955.
16. Thomas D.J.I., Morgan J.A.W., Whipps J.M., Saunders J.R. Appl. Environ. Microbiol., 2000, v. 66, p. 118—124.
17. Корецкая Н.Г., Светоч О.Е., Добрица А.П. Докл. АН СССР, 1988, т. 303, с. 488—491.
18. Mahillon J., Rezsohazy R., Hallet B., Delcour J. Genetica. 1994, v. 93, 1—3, p. 13—26.
19. González J.M., Jr., Dulmage H.T., Carlton B.C. Plasmid, 1981, v. 5, p. 351—365.
20. Lereclus D., Ribier J., Klier A., Menon G., Lecadet M.-M. EMBO J., 1984, v. 3, p. 2561—2567.
21. Feitelson J.S. In: Advanced engineered pesticides. Ed. by I. Kim. New York. Marcel Dekker, Inc. 1993, p. 63—72.
22. Bravo A., Sarabia S., Lopez L., e. a. Appl. Environ. Microbiol., 1998, v. 64, № 12, p. 4965—4972.
23. Hüfte H., Whiteley H.R. Microbiol. Rev., 1989, v. 53, p. 242—255.
24. Knowles B.H. Adv. Insect Physiol., 1994, v. 24, p. 275—308.
25. Rajamohan F., Lee M.K., Dean D.H. In: Progress in nucleic research and molecular biology, vol. 60. New York, Academic Press, 1998, p. 1—27.
26. Hubert H. E., Lathy P. In: Pathogenesis of invertebrate microbial disease. Ed. by E. Davidson. Totowa, New Jersey, Allanheld Osmun, 1981, p. 209—234.
27. Grayson J.M. Ann. Entomol. Soc. Am., 1958, v. 51, p. 403—405.

28. Koller C.N., Bauer L.S., Hollingworth R.M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, v. 184, p. 692—699.
29. Andrews R.E., Jr., Faust R.M., Wabiko H., Raymond K.C., Bulla L. A., Jr. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, 1987, v. 6., № 2, p. 163—232.
30. Federici B.A., Maddox J.V. *Bioscience*, 1996, v. 46, № 6, p. 410—421.
31. Lereclus D., Agaisse H., Gominet M., Chaufaux J. *Bio/Technology*, 1995, v. 13, p. 67—71.
32. Barnes A.C., Cummings S.E. U.S. Patent 4,695,455, 1987.
33. Lecadet M.-M., Chaufaux J., Ribier J., Lereclus D. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, v. 58, p. 840—849.
34. Wu D., Johnson J.J., Federici B.A. *Mol. Microbiol.*, 1994, v. 13, p. 965—972.
35. Lee M.K., Curtiss A., Alcantara E., Dean D.H. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, v. 62, p. 583—586.
36. Adams L.F., Mathewes S., O'Hara P., Petersen A., Gurtler H. *Mol. Microbiol.*, 1994, v. 14, p. 381—389.
37. Baum J.A., Malvar T. *Mol. Microbiol.*, 1995, v. 18, p. 1—12.
38. Park H. W., Ge B., Bauer L. S., Federici B. A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, v. 64, p. 3932—3938.
39. Park H.W., Bideshi D.K., Federici B.A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, v. 66, № 10, p. 4449—4455.
40. Патент РФ № 2125091, 1999.
41. Feitelson J.S., Quick T.C., Gaertner F. In: *New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases*. Eds. R. R. Baker, P. Dunn. New York, Alan R. Liss, Inc., 1990, p. 561—571.
42. Mermod N., Ramos J.L., Lehrbach P.R., Timmis K.N. *J. Bacteriol.*, 1986, v. 167, 2, p. 447—454.
43. Worsley M.J., Williams P.A. *J. Bacteriol.*, 1975, v. 124, p. 7—13.
44. Altenbuchner J. *Nucleic Acids Research*, 1988, v. 16, p. 8710.
45. Penfold R.J., Pemberton J.M. *Nucleic Acids Res.*, 1990, v. 18, p. 5913.
46. Simon R., Priefer U., Puhler A. *Biotechnology*, 1983, v. 1, p. 37—45.
47. Dobritsa A.P., Kolombet L.V., Galkina N.N., Koretskaya N.G., Kochetkov V.V. In: *Plant growth-promoting rhizobacteria. Present status and future prospects*. Eds. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino. Sapporo, 1997. p. 217—220.
48. Лосева О.И., Куркутадзе М.Д., Добрица А.П., Потехин С.А. *Биоорганическая химия*, 1996, т. 22, № 12, с. 900—906.
49. Potekhin S.A., Loseva O.I., Tiktopulo E.I., Dobritsa A.P. *Biochemistry*, 1999, v. 38, p. 4121—4127.
50. Лосева О.И., Тиктопуло Е.И., Добрица А.П., Потехин С.А. *Мол. биология*, 2000, т. 14, № 1, с. 123—129.
51. Тиктопуло Е.И., Лосева О.И., Васильев В. Д., Добрица А.П., Потехин С.А. *Мол. биология*, 2000, т. 34, № 1, с. 130—136.
52. Loseva O.I., Tiktopulo E.I., Vasiliev V.D., Nikulin A.D., Dobritsa A.P., Potekhin S.A. *Biochemistry*, 2000, v. 40, p. 14143—14151