СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ. АГРОНОМИЯ

DOI: 10.32786/2071-9485-2020-03-16

ANTAGONISTS OF BACTERIAL ORIGIN – MOLECULAR AND GENETIC IDENTIFICATION AND CERTIFICATION IN PLANT PROTECTION

V. P. Terletskiy

*Federal State Budget Scientific Institution «All-Russian Institute of Plant Protection»,
St. Petersburg, Russia*

Received 15.05.2020

Submitted 14.08.2020

*The studies were carried out as part of the implementation of project No.0665-2019-0019
«Development of ecological and genetic basis for selection of strains of microbial antagonists, entomopathogenic fungi and nematodes; development of technology of generation and application of new polyfunctional biopreparations for control over harmful organisms (pests, pathogens) and for increasing soil suppressiveness»*

Summary

The article presents the results of validation of genotyping technique based on idea of double digest and selective label of microorganism genomic DNA for strain identification and certification of commercially used antagonists of bacterial origin. Genetic certification is a valuable tool in resolving copyright dispute issues and can be used for elucidation of genetic variability in collections of field bacterial isolates.

Abstract

Introduction. In recent years, much attention has been paid to the production of environmentally friendly agricultural products. This is due to the accumulation of data on the harmful health effects while consuming chemically contaminated products. As an alternative to the use of chemical plant protection reagents, biological methods of suppressing the activity of phytopathogens and harmful insects are considered. These biological agents include bacteria of *Streptomyces* group, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *X. nematophila* and others. Certain strains of these bacteria have demonstrated antagonistic activity useful in the development of effective biopreparations as biocontrol agents in plant protection schemes. Industrial production of such biopreparations is associated with the need for regular quality control of bacterial strains. First of all, this concerns the confirmation of the identity of the strain of the bacterial antagonist to previously developed original strain. The most reliable way to confirm is to apply genetic methods that take into account changes in the structure of DNA. Currently, there are many molecular genetic identification methods based on the digestion of DNA by enzymes, polymerase chain reaction and DNA sequencing. **Object.** The object of the study are strains of several types of bacteria used as antagonists of phytopathogenic organisms. **Materials and methods.** The proposed method of genetic certification of bacterial strains is based on double digest and selective label of DNA fragments (DDSL). This method was originally developed for clinical isolates of a number of human and animal pathogens. The essence of the proposed method consists in the use of two restriction endonucleases and simultaneous labeling of the obtained DNA fragments of the bacterium with biotinylated deoxycytosine triphosphate (Bio-dctp). The digest of DNA by the first endonuclease leads to the formation of 3'-recessed ends of the fragments, which in fill-in reaction using Taq polymerase incorporate the Bio-dctp tag. Simultaneous digest of DNA by a second endonuclease results in blunt ends or 3'-protruding ends that cannot include a label (polymerization always goes from 5' to 3' end). Thus, a limited number of labeled DNA fragments will be present in the reaction, which, after electrophoresis in a conventional agarose gel and transfer to a filter, are visualized as clearly visible colored bands. **Results and conclusion.** The number of detectable bands on the filter is determined by the number of DNA recognition and digestion sites by the first restriction endonuclease. In our case, when using a pair of *SgsI*/*Eco24I* enzymes in *B. thuringiensis*, only a few bands were detected, which is explained by a small number of recognition sites in this genome by the *SgsI* enzyme. Too few such sites lead to a decrease in the information content of the genetic profile. The combination of

SgsI/Eco32I enzymes in *B. subtilis* and *X. nematophila* led to the detection of 20–40 bands. Using the proposed method of genotyping not only allows identification of bacterial strains, but also reveals the genetic diversity of the population of a microorganism of this species in nature. Preliminary work allowed us to select the optimal combination of enzymes for DNA digestion and to apply the best reaction conditions for the genotyping of antagonistic bacteria. The resulting "barcode" is a proof (certification) of the identity in the compared bacteria. Genetic certification should become necessary element in the control of biopreparation quality and in resolving dispute issues of copyright concerning strains of antagonistic bacteria developed and proposed for commercial production.

Key words: *genotyping, DNA fragments, certification, antagonistic strains.*

Citation. Terletskiy V.P. Antagonists of bacterial origin – molecular and genetic identification and certification in plant protection. *Proc. of the Lower Volga Agro-University Comp.* 2020. 3(59). 163-173 (in Russian). DOI: 10.32786/2071-9485-2020-03-16.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

УДК 579.64:632

АНТАГОНИСТЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПРИРОДЫ – МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ПАСПОРТИЗАЦИЯ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ

В. П. Терлецкий, доктор биологических наук, профессор

*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений»,
г. Санкт-Петербург*

Дата поступления в редакцию 15.05.2020

Дата принятия к печати 14.08.2020

Работа выполнена по теме Государственного задания 0665-2019-0019 «Разработка эколого-генетических основ отбора штаммов микробов-антагонистов, энтомопатогенных грибов и нематод; разработка технологий получения и применения новых полифункциональных препаратов для контроля численности вредных организмов (вредители, возбудители болезней) и повышения супрессивности почвы»

Актуальность. В последние годы получению экологически чистой сельскохозяйственной продукции уделяют большое внимание. Связано это с накоплением данных о вреде для здоровья употребления в пищу загрязненной химикатами продуктов. В качестве альтернативы использованию химических средств защиты растений рассматривают биологические методы подавления активности фитопатогенов и вредных насекомых. К таким биологическим агентам относят бактерии группы *Streptomyces*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *X. nematophila* и др. Отдельные штаммы этих бактерий хорошо зарекомендовали себя как антагонисты в разработке эффективных биопрепаратов в биологической защите растений. Промышленное производство таких биопрепаратов сопряжено с необходимостью регулярного контроля качества выпускаемой продукции. Прежде всего, это касается подтверждения идентичности штамма бактерии-антагониста разработанному ранее оригиналу. Самым надежным способом подтверждения являются генетические методы, учитывающие изменения в структуре ДНК. В настоящее время существует множество методов молекулярно-генетической идентификации, основанных на расщеплении ДНК ферментами, полимеразной цепной реакции и секвенировании ДНК. Объект. Объектом исследования являются штаммы нескольких видов бактерий, используемых в качестве антагонистов фитопатогенных организмов. Материалы и методы. Предложенный к использованию метод генетической паспортизации бактериальных штаммов основан на двойном расщеплении и избирательном мечении фрагментов ДНК (ДРИМ). Данный метод изначально был разработан для клинических изолятов ряда патогенов человека и животных. Суть предлагаемого метода состоит в использовании двух эндонуклеаз рестрикции и одновременном мечении получаемых фрагментов ДНК бактерии биотинилированным дезоксицитозин трифосфатом (Bio-dCTP). Расщепление ДНК первой эндонуклеазой приводит к образованию 3'-усеченных концов фрагментов, которые в реакции заполнения с помощью Taq-полимеразы

включают метку Bio-dCSP. Одновременное расщепление ДНК второй эндонуклеазой имеет результатом тупые концы либо 3'-выступающие концы, которые не могут включать метку (полимеризация всегда идет в направлении от 5' к 3' концу). Таким образом, в реакции будут присутствовать ограниченное число меченых фрагментов ДНК, которые после электрофореза в обычном агарозном геле и переноса на фильтр, визуализируются в виде четко различимых окрашенных полос. Результаты и выводы. Количество выявляемых полос на фильтре определяется числом сайтов расщепления ДНК первой эндонуклеазой рестрикции. В нашем случае при использовании пары ферментов SgsI/Eco24I у *B.thuringiensis* выявлялось всего несколько полос, что связано с малым числом сайтов расщепления в этом геноме ферментом SgsI. Слишком малое число таких сайтов приводит к снижению информативности генетического профиля. Комбинация ферментов SgsI/Eco32I у *B.subtilis* и *X.nematophila* привела к детекции 20-40 полос. Использование предлагаемого метода генотипирования не только позволяет провести идентификацию бактериальных штаммов, но и оценить генетическое разнообразие популяции микроорганизма данного вида в природе. Предварительная работа позволила найти оптимальную комбинацию ферментов для расщепления ДНК и подобрать условия проведения процедуры генотипирования бактерий-антагонистов фитопатогенов. Получаемый «штрих-код» является доказательством (опровержением) идентичности сравниваемых бактерий. Генетическая паспортизация должна стать необходимым элементом в контроле качества продукции и при решении спорных вопросов об авторских правах на разработанные и предложенные производству штаммы бактерий-антагонистов.

Ключевые слова: бактерии-антагонисты, генотипирование бактерий-антагонистов, защита растений, паспортизация бактериальных штаммов, штаммы-антагонисты.

Цитирование. Терлецкий В. П. Антагонисты бактериальной природы – молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация в защите растений. *Известия НВ АУК*. 2020. 163-173. DOI: 10.32786/2071-9485-2020-03-16.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Введение. Широкое и бесконтрольное применение пестицидов химической природы в сельскохозяйственном производстве привело к накоплению в почве значительных концентраций вредных веществ, некоторые из них обладают канцерогенной активностью. Поэтому в последние годы в ряде стран, в том числе в России, особое внимание уделяется разработке и применению альтернативных способов борьбы с фитопатогенными микроорганизмами и вредителями, которые зачастую не уступают по эффективности и рентабельности использования химическим средствам [1]. В частности, на рынке появляются биопрепараты с полифункциональным механизмом действия и комплексные препараты, включающие микробы-антагонисты и хитозан [5]. Ученые уже давно заметили, что отдельные микроорганизмы способны подавлять рост и размножение фитопатогенов. Например, этими свойствами обладают некоторые штаммы *B.subtilis*, *B.thuringiensis*, стрептомицеты, грибы и т.д. [2, 4]. В литературе имеется множество указаний на эффективность применения бактерий-антагонистов в защите сельскохозяйственных растений многих видов, таких как перец, рис и др. [8, 10]. Эффективность подавления патогена достигает 84,4%. Кроме этого, антагонисты повышают резистентность посредством индукции синтеза ферментов с антиоксидантной активностью [10]. Биологические средства иногда рекомендуют использовать совместно с традиционными химическими [6].

Молекулярные механизмы подавления фитопатогенов и вредных насекомых включают в себя выработку антагонистами антимикробных веществ, фермента хитиназы, который разрушает покров членистоногих вредителей, конкуренцию за питательные вещества. В числе соединений, вызывающих разрушение клеточной стенки грибов, называют сурфактин, итурин и фенгицин [8].

Интересным представляется использование в защите растений грам-

отрицательной бактерии *Xenorhabdus nematophila*, которая обитает в пищеварительном тракте нематод и при инвазии жесткокрылых насекомых выходит в кишечник последних, приводя к их гибели. В результате нематоды получают необходимую им пищу, а бактерии имеют возможность распространяться во внешней среде, используя нематоду как вектор [3].

В процессе производства биопрепарата есть риск попадания в реактор других менее активных штаммов данного микроорганизма либо контаминация совершенно другими видами, способными вытеснить оригинальный полезный штамм в процессе размножения. Зачастую доказать идентичность выпускаемого бактериального биопрепарата оригиналу по фенотипическим свойствам (микроскопия, биохимические свойства, потребности в питательных веществах и т.д.) затруднительно. Здесь на помощь приходят современные молекулярно-генетические методы, вскрывающие генетические особенности каждого штамма [7].

Видовая принадлежность бактерий обычно определяется секвенированием генов 16S РНК, в некоторых случаях удается достичь разрешения на уровне штаммов. Например, путем частичного секвенирования генов 16S РНК бактериальные изоляты отнесли к видам *Bacillus safensis* (CQ1), *Bacillus subtilis* (CQ2), *Bacillus tequilensis* (CQ3), которые были эффективными в отношении личинок некоторых вредных насекомых, однако внутривидового уровня дискриминации достигнуто не было [9]. Работа с *Xenorhabdus nematophila*, экспрессирующая бинарный токсин PirAB, обладающий инсектицидной активностью, также проводится с проведением секвенирования генов 16S РНК [11]. В литературе появились сообщения, что широко используемая в биозащите бактерия *Bacillus thuringiensis* (Bt) может приводить к диарее у людей, наподобие заболевания, вызываемого близкородственной бактерий *B. cereus*. Появились даже утверждения, что эти два вида бактерий неразличимы друг от друга. Однако в последние годы такой риск не подтвержден. Более того, доказывалось, что штаммы Bt, являясь инсектицидными, абсолютно безвредны для млекопитающих, а использование современных методов генотипирования, таких как мультилокусное секвенирование (MLST), способно дискриминировать эти два вида. MLST-анализ показал, что ни один из 2000 изолятов, проанализированных секвенированием, не был причиной диареи [12]. MLST сейчас используется для генотипирования различных видов бактерий, в частности, *Bacillus thuringiensis*. В последнем случае часто используют семь генов «домашнего хозяйства» *glpF*, *gmK*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *rusA* и *trpI*. В недавней работе попытались установить связь между генотипами MLST и серотипами бактерии. Оказалось, что в ряде случаев связь отсутствовала [13]. Таким образом, данный метод генотипирования не полностью вскрывает генетические особенности отдельных изолятов.

Генетическая идентификация на уровне бактериального штамма с целью его паспортизации является более сложной задачей и требует использования высокоразрешающих методов. К широко известным методам можно отнести метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) со случайными праймерами (RAPD). Данный метод технически очень прост, позволяет получить «штрих-коды» достаточно быстро, однако имеет серьезные недостатки, к которым можно отнести недостаточную информативность по индексу дискриминации (способность различать штаммы) и низкую воспроизводимость. Гораздо более сложным методом генотипирования штаммов является метод, основанный на пульс-гель электрофорезе. Подход является популярным в превентивной медицине для выявления путей распространения инфекции и идентификации источника патогена. Его использование ограничено высокой стоимостью необходимого оборудования, значительными трудозатратами на проведение анализа и длительностью процеду-

ры. Тем не менее, его до сих пор называют «золотым стандартом» генотипирования благодаря высокому индексу дискриминации.

Материалы и методы. В лаборатории микробиологической защиты растений ФГБНУ ВИЗР разрабатываются и используются методы идентификации и паспортизации бактериальных штаммов [7]. В частности, предложена идея двойного расщепления и избирательного мечения (ДРИМ) фрагментов ДНК (рисунок 1), которая ранее доказала свою эффективность для клинических изолятов патогенных бактерий, а также в отношении штаммов-антагонистов фитопатогенов. В работе использовали культуры *B.subtilis*, *B.thuringiensis* и *X.nematophila* для оценки потенциала метода генотипирования ДРИМ для дискриминации этих видов на уровне штаммов.

Первым этапом работы была оптимизация процедуры выделения геномной ДНК из грам-положительных микроорганизмов *B.thuringiensis* и *B.subtilis*. Особенности строения клеточной стенки, которая обладает резистентностью к лизису в обычных буферах, предполагает использование специальных лизирующих ферментов, таких как лизоцим. Для этого микроорганизм культивируют в среде с целью получения чистой культуры. Был исследован ряд подходов к выделению ДНК и метод, основанный на использовании лизоцима для разрушения клеточной стенки, оказался наиболее эффективным. Выделение ДНК из *X.nematophila* проводили аналогичным образом, за исключением использования лизоцима.

К настоящему времени геномы изучаемых бактерий полностью секвенированы, то есть известна их полная нуклеотидная последовательность. Это облегчает задачу подбора пар ферментов рестрикции для расщепления и последующего избирательного мечения фрагментов ДНК. Для этого мы используем доступную в Интернете программу (<http://insilico.ehu.es/DDSL>).

В реакции ДРИМ одновременно используется две эндонуклеазы рестрикции. Поиск in-silico выявил, что лучшей первой эндонуклеазой рестрикции для *X.nematophila* является SgsI, имеющая сайт узнавания и расщепления GG↓CGCGCC. Этот же фермент может быть использован и для *B.subtilis* и *B.thuringiensis*, однако в последнем случае имеется всего несколько сайтов расщепления и, соответственно, можно ожидать ограниченное число меченых фрагментов ДНК.

В целом, первый фермент должен производить небольшое число фрагментов ДНК с «липкими» (3-штрих усеченными) концами в соответствующих геномах. Эти фрагменты метятся биотинилированным дезоксицитозин трифосфатом (Bio-dCTP) с помощью Taq-полимеразы. Получаемые фрагменты ДНК не могут быть разделены в обычном агарозном геле, так как являются слишком большими. Поэтому в реакцию одновременно вводили вторую эндонуклеазу рестрикции – Eco24I для *B.thuringiensis* и Eco32I для *X.nematophila*. В обоих геномах имеется около 1000 сайтов расщепления для этих ферментов. В результате такого двойного расщепления размер фрагментов ДНК уменьшается и является оптимальным для разделения в агарозном геле. Особенностью второго фермента является то, что получаемые фрагменты ДНК имеют тупые концы либо 5-штрих усеченные, которые не могут включить метку Bio-dCTP. Таким образом, в реакционной смеси присутствует небольшое количество содержащих метку фрагментов ДНК, которые разделяются по размеру в процессе электрофореза и затем визуализируются на фильтре (рисунок 1).

В качестве маркера длин фрагментов ДНК использовали ДНК фага лямбда, расщепленную двумя эндонуклеазами рестрикции – BstEII и HindIII, которые метили Bio-dCTP с помощью Taq-полимеразы в реакции заполнения (fill-in reaction).

Двойное расщепление и избирательное мечение проводится внесением в реакционную пробирку соответствующих количеств дистиллированной воды, 10-кратного буфера для обеих эндонуклеаз рестрикции, бактериальной ДНК и ферментной смеси (две эндонуклеазы рестрикции, Taq-полимеразы и Bio-dCTP). Смесь инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. Возможно использование быстрого протокола «Fast digest», уменьшающего время реакции до 5 минут. После проведения ферментативной реакции проводили электрофорез в 0,8 % агарозном геле в течение 16 часов при постоянном напряжении 50В. Фрагменты ДНК, разделенные по размеру, переносили на нейлоновый фильтр, используя установку вакуумного переноса. Процесс происходил в воде, т.к. денатурация и нейтрализация ДНК не требуется. Детекцию фрагментов ДНК на фильтре проводили с помощью цветной химической реакции, основанной на выявлении щелочной фосфатазы с применением реагентов NBT и BCIP (Thermo Fisher Scientific). В результате меченые фрагменты ДНК окрашиваются в интенсивный синий цвет, формируя полосы на фильтре (генетический профиль, «штрих-код»).

Рисунок 1 – Схема проведения генотипирования (паспортизации) бактериальных штаммов

Figure 1 – Scheme of conducting genotyping (certification) of bacterial strains

Результаты и обсуждение. Размер выявляемых фрагментов ДНК в маркере длин фрагментов варьировал от 1929 до 23 130 пар оснований. Генотипирование пяти штаммов *B. subtilis*, которые используются в качестве активного компонента в промышленно выпускаемых биопрепаратах, позволило идентифицировать идентичные штаммы 1 и 2, 3 и 4, а также штамм B10 (рисунок 2, дорожка под номером 5).

Генотипирование штаммов *B. thuringiensis* выявило 2 группы (Е/П, Е, Т и 14, 75). Значительные генетические отличия выявлены в штаммах Л и 10 с уникальным генетическим профилем. В качестве контрольного штамма использовали коллекционный штамм M22 сенной палочки (рисунок 3).

Рисунок 2 – Генотипирование методом ДРИМ пяти штаммов *B. subtilis* с использованием ферментов SgsI/Eco32I, М – маркер длин фрагментов ДНК

Figure 2 – Genotyping by DDSL technique of five *B. subtilis* isolates using SgsI/Eco32I enzymes, М – DNA fragment size marker

Рисунок 3 – Генетические профили штаммов *B. thuringiensis*, выявляемые парой ферментов SgsI/Eco24I, ДНК, к – контрольный штамм (штамм B10 *B. subtilis*, ферменты SgsI/Eco32I)

Figure 3 – Genetic profiles of *B. thuringiensis* strains revealed by SgsI/Eco24I pair of enzymes, к – control strain (B10 strain of *B. subtilis*, SgsI/Eco32I enzymes)

В связи с тем, что фермент SgsI имеет всего несколько сайтов расщепления в геноме *B.thuringiensis*, на генетическом профиле видно небольшое число фрагментов ДНК. Такое число фрагментов не позволяет добиться высокого разрешения при идентификации бактериальных штаммов. Например, штаммы Л, 14 и 75, а также Е/П, Е и Т не различимы между собой (рисунок 3), в то же время полученные нами ранее данные генотипирования с большим числом фрагментов (ферменты SgrAI/Eco24I) указывают на идентичность только двух штаммов - Е/П и Е, в то время как остальные штаммы отличаются друг от друга. Рассмотрение генетических профилей указывает на относительную удаленность штамма В10. Это наблюдение соответствует данным по культуральным и биохимическим свойствам данного штамма.

В генотипировании методом ДРИМ *Xenorhabdus nematophila* было использовано 3 изолята бактерии, выделенные из разных источников, – J, П и С/3 (рисунок 4). Штамм J генетически сильно отличается от двух других, которые оказались генетически идентичными. Другие свойства последних двух штаммов также указывают на их близость.

Рисунок 4 – Генетические профили трех штаммов *X.nematophila*, выявляемые парой ферментов SgsI/Eco32I, к – контрольный образец (штамм M22 *B.subtilis*, ферменты SgsI/Eco32I)

Figure 4 – Genetic profiles of three *X.nematophila* strains revealed by SgsI/Eco32I pair of enzymes, к – control strain (M22 strain of *B.subtilis*, SgsI/Eco32I enzymes)

Распределение фрагментов ДНК в изолятах *X.nematophila* П и С/3 говорит либо об их полной генетической идентичности, либо о высокой степени генетической близости. Не исключено, что, используя другие методы генотипирования, удастся их различить. Вероятно, они отличаются друг от друга на уровне всего одного или нескольких генов, которые ускользают при скрининге с ограниченным числом выявляемых геномных локусов. При появлении генетических различий между штаммами в процессе эволюции, методы генотипирования начинают улавливать эти изменения в последовательности ДНК. Естественно, чем большее число фрагментов ДНК учитывается, тем боль-

шее разрешение имеет данный метод. Метод ДРИМ позволяет идентифицировать одновременно до 40 фрагментов ДНК, что является рекордным показателем для методов генотипирования, основанных на полиморфизме длин рестрикционных фрагментов (RAPD – 5-10 фрагментов, PFGE – 15-20 фрагментов). Секвенирование ДНК выявляет любые изменения в последовательностях нуклеотидов, однако при этом ускользают другие важные изменения в геномах, такие как паттерны метилирования. Методы генотипирования, основанные на использовании эндонуклеаз рестрикции, способны детектировать изменения в метилировании, что придает им особую ценность.

Выводы. Таким образом, предлагаемый способ идентификации бактериальных штаммов является удобным инструментом паспортизации бактерий с антагонистической активностью. Последние часто используются в качестве основы в разработке и производстве биопрепаратов для защиты растений от патогенных микроорганизмов и вредителей. При подборе ферментов рестрикции нужно обращать внимание на число сайтов расщепления первой эндонуклеазой рестрикции в изучаемом геноме. Слишком малое число таких сайтов приводит к снижению информативности генетического профиля.

Библиографический список

1. Биологическая и химическая защита картофеля от болезней / М. К. Деревягина, С. В. Васильева, В. Н. Зейрук, Г. Л. Белов // *Агрохимический вестник*. 2018. №5. С. 65-68.
2. Биологическая эффективность новых биопрепаратов на основе микробов-антагонистов для контроля возбудителей болезней картофеля при вегетации и хранении клубней / И. И. Новикова, Ю. А. Титова, И. В. Бойкова, В. Н. Зейрук, И. Л. Краснобаева // *Биотехнология*. 2017. Т. 33. № 6. С. 68-76. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-68-76.
3. Данилов Л. Г., Павлюшин В. А. Состояние, перспективы изучения и практического использования энтомопатогенных нематод (Steinernematidae) и их симбиотических бактерий (*Xenorhabdus*) против насекомых и возбудителей заболеваний растений // *Вестник защиты растений*. 2015. № 3(85). С. 10-15.
4. Мультибиоконверсионные твердофазные биопрепараты нового поколения на основе *Bacillus subtilis* и *Trichoderma asperellum* повышают эффективность защиты картофеля от фитофтороза / Ю. А. Титова, И. И. Новикова, И. В. Бойкова, В. А. Павлюшин, И. Л. Краснобаева // *Сельскохозяйственная биология*. 2019. Т. 54. № 5. С. 1002-1013. DOI: 10.15389/agrobology.2019.5.1002rus.
5. Оценка эффективности совместного применения хитозана и микробов-антагонистов в защите яровой мягкой пшеницы от болезней с использованием спектрометрического анализа / Л. Е. Колесников, И. И. Новикова, В. Г. Сурин, Э. В. Попова, Н. С. Прияткин, Ю. Р. Колесникова // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2018. Т. 54. № 5. С. 546-552. DOI: 10.1134/S0555109918050082.
6. Совместное применение микробного препарата биокомпозит-коррект и химического фунгицида / С. Д. Каракотов, Н. В. Аршава, К. Н. Божко, Е. В. Желтова // *Защита и карантин растений*. 2019. № 9. С. 13-15.
7. Эффективный метод генетической паспортизации штаммов *Bacillus subtilis* – перспективных продуцентов биопрепаратов / В. П. Терлецкий, В. И. Тыщенко, И. И. Новикова, И. В. Бойкова, С. Д. Тюлебаев, И. Я. Шахтамиров // *Микробиология*. 2016. Т. 85. № 1. С. 50-55. DOI:10.7868/S0026365616010134.
8. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* via Induction of the Defense Mechanism and Antimicrobial Compounds Produced by *Bacillus subtilis* SL-44 on Pepper (*Capsicum annuum* L.) / Z. Wu, Y. Huang, Y. Li, J. Dong, X. Liu, C. Li // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 2676. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02676. eCollection 2019.
9. Highly effective bacterial agents against *Cimex quadrimaculatus* (Hymenoptera: Cimicidae): isolation of bacteria and their insecticidal activities / F. O. Cakici, I. Ozgen, H. Bolu, Z. Erbas, Z. Demirbag, I. Demir // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 31. N1. P. 59-67. DOI: 10.1007/s11274-014-1764-3.

10. Jamali H., Sharma A., Roohi S.A.R. Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* RH5 against sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani* // J. Basic Microbiol. 2020. V. 60. N3. P. 268-280. DOI: 10.1002/jobm.201900347.

11. PirAB protein from *Xenorhabdus nematophila* HB310 exhibits a binary toxin with insecticidal activity and cytotoxicity in *Galleria mellonella* / Q. Yang, J. Zhang, T. Li, S. Liu, P. Song, Z. Nangong, Q. Wang // J. Invertebr. Pathol. 2017. V. 148. P. 43-50. DOI: 10.1016/j.jip.2017.04.007.

12. Raymond B., Federici A. In defense of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity - a response to EFSA // FEMS Microbiol. Ecol. 2017. V. 93. N7. DOI: 10.1093/femsec/fix084.

13. Systematic characterization of *Bacillus* Genetic Stock Center *Bacillus thuringiensis* strains using Multi-Locus Sequence Typing / K. Wang, C. Shu, M. Soberón, A. Bravo, J. Zhang // J. Invertebr. Pathol. 2018. V. 155. P. 5-13. DOI: 10.1016/j.jip.2018.04.009.

Conclusions. Thus, the proposed method for identifying bacterial strains is a convenient tool for certification of bacteria with antagonistic activity. The latter are often used as a basis in the development and production of biological products to protect plants from pathogenic microorganisms and pests. When selecting restriction enzymes, attention should be paid to the number of recognition sites of the first restriction endonuclease in the studied genome. Too few such sites lead to a decrease in the information content of the genetic profile.

Reference

1. Biologicheskaya i himicheskaya zashchita kartofelya ot boleznej / M. K. Derevyagina, S. V. Vasil'eva, V. N. Zejruk, G. L. Belov // Agrohimicheskij vestnik. 2018. №5. P. 65-68.

2. Biologicheskaya jeffektivnost' novyh biopreparatov na osnove mikrobov-antagonistov dlya kontrolya vzbuditelej boleznej kartofelya pri vegetacii i hranenii klubnej / I. I. Novikova, Yu. A. Titova, I. V. Bojkova, V. N. Zejruk, I. L. Krasnobaeva // Biotehnologiya. 2017. Vol. 33. № 6. P. 68-76. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-68-76.

3. Danilov L. G., Pavlyushin V. A. Sostoyanie, perspektivy izucheniya i prakticheskogo ispol'zovaniya jentomopatogennyh nematod (*Steinernematidae*) i ih simbioticheskikh bakterij (*Xenorhabdus*) protiv nasekomyh i vzbuditelej zabojevanij rastenij // Vestnik zashchity rastenij. 2015. № 3(85). P. 10-15.

4. Mul'tibiotikonversionnye tverdogaznye biopreparaty novogo pokoleniya na osnove *Bacillus subtilis* i *Trichoderma asperellum* povyshayut jeffektivnost' zashchity kartofelya ot fitoftoroza / Yu. A. Titova, I. I. Novikova, I. V. Bojkova, V. A. Pavlyushin, I. L. Krasnobaeva // Sel'skohozyajstvennaya biologiya. 2019. Vol. 54. № 5. P. 1002-1013. DOI: 10.15389/agrobiology.2019.5.1002rus.

5. Ocenka jeffektivnosti sovmestnogo primeneniya hitozana i mikrobov-antagonistov v zashchite yarovoj myagkoj pshenicy ot boleznej s ispol'zovaniem spektrometricheskogo analiza / L. E. Kolesnikov, I. I. Novikova, V. G. Surin, Je. V. Popova, N. S. Priyatin, Yu. R. Kolesnikova // Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. 2018. Vol. 54. № 5. P. 546-552. DOI: 10.1134/S0555109918050082.

6. Sovmestnoe primeneniye mikrobnogo preparata biokompozit-korrekt i himicheskogo fungicida / S. D. Karakotov, N. V. Arshava, K. N. Bozhko, E. V. Zheltova // Zashchita i karantin rastenij. 2019. № 9. P. 13-15.

7. Effektivnyj metod geneticheskoy pasportizacii shtammov *Bacillus subtilis* - perspektivnyh producentov biopreparatov / V. P. Terleckij, V. I. Tyschenko, I. I. Novikova, I. V. Bojkova, S. D. Tyulebaev, I. Ya. Shahtamirov // Mikrobiologiya. 2016. Vol. 85. № 1. P. 50-55. DOI:10.7868/S0026365616010134.

8. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* via Induction of the Defense Mechanism and Antimicrobial Compounds Produced by *Bacillus subtilis* SL-44 on Pepper (*Capsicum annuum* L.) / Z. Wu, Y. Huang, Y. Li, J. Dong, X. Liu, C. Li // Front. Microbiol. 2019. Vol. 10. P. 2676. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02676. eCollection 2019.

9. Highly effective bacterial agents against *Cimbex quadrimaculatus* (Hymenoptera: Cimbicidae): isolation of bacteria and their insecticidal activities / F. O. Cakici, I. Ozgen, H. Bolu, Z. Erbas, Z. Demirbağ, I. Demir // World J. Microbiol. Biotechnol. 2015. Vol. 31. N1. P. 59-67. DOI: 10.1007/s11274-014-1764-3.

10. Jamali H., Sharma A., Roohi S.A.R. Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* RH5 against sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani* // J. Basic Microbiol. 2020. Vol. 60. N3. P. 268-280. DOI: 10.1002/jobm.201900347.

11. PirAB protein from *Xenorhabdus nematophila* HB310 exhibits a binary toxin with insecticidal activity and cytotoxicity in *Galleria mellonella* / Q. Yang, J. Zhang, T. Li, S. Liu, P. Song, Z. Nangong, Q. Wang // J. Invertebr. Pathol. 2017. Vol. 148. P. 43-50. DOI: 10.1016/j.jip.2017.04.007.

12. Raymond B., Federici A. In defense of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity - a response to EFSA // FEMS Microbiol. Ecol. 2017. Vol. 93. N7. DOI: 10.1093/femsec/fix084.

13. Systematic characterization of *Bacillus* Genetic Stock Center *Bacillus thuringiensis* strains using Multi-Locus Sequence Typing / K. Wang, C. Shu, M. Soberón, A. Bravo, J. Zhang // J. Invertebr. Pathol. 2018. Vol. 155. P. 5-13. DOI: 10.1016/j.jip.2018.04.009.

Author Information

Terletskiy Valery Pavlovich, senior researcher of All-Russian Institute of Plant Protection (196608 Podbelskogo 3, St. Petersburg-Pushkin), Doctor of Biological Sciences, Professor, tel.: +7 921-558-7957, e-mail: valeriter@mail.ru

Информация об авторе

Терлецкий Валерий Павлович, старший научный сотрудник ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (196608, Санкт-Петербург-Пушкин, шоссе Подбельского, 3), доктор биологических наук, профессор, тел. +7 921-558-7957, e-mail: valeriter@mail.ru