

## Микросимбионт колорадского жука *Enterobacter* spp экспрессирующий ген *gfp*-белка для исследования взаимодействия в системе растение-хозяин-фитофаг

Д. К. Благова\*, А. В. Сорокань, Г. В. Беньковская

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Россия, Республика Башкортостан, 450054 Уфа, проспект Октября, 71.

\*Email: fortyanns@googlemail.com

Для оценки роли микросимбионтов колорадского жука во взаимодействии с растением картофеля предложена линия *Enterobacterspp* экспрессирующая светящийся белок *gfp*. Описан протокол получения рекомбинантов и кормления жуков.

**Ключевые слова:** колорадский жук, микросимбионты, *Enterobacter*, *GFP*.

Присутствие микросимбионтов в организме животных, в том числе насекомых, и их участие в жизнедеятельности хозяев изучается на протяжении многих лет. Установлено сосуществование насекомых с экто- и эндосимбионтными микроорганизмами, показано, что роль эктосимбионтов очень значительна – они активно защищают своих хозяев, а также участвуют в формировании трофических связей в биоценозах [1, 2]. Состав эндосимбионтов у особей одного вида насекомых может достаточно сильно различаться в пределах ареала. Так, обнаружено, что колорадский жук, известный своей пластичностью и широкой экспансией на территории вторичного ареала, в популяциях Польши находится в симбиотических отношениях с *Flavobacterium* [3]. Тогда как в турецкой популяции в пищеварительной системе особей этого вида обнаружены *Acinetobacter*, *Leclercia*, *Enterobacteri* *Pseudomonas* [4]. В нашей работе мы также в популяции колорадского жука на Южном Урале обнаружили представителей *Acinetobacter* и *Enterobacter* [5]. Состав эндосимбионтов может сильно различаться в зависимости от интенсивности инсектицидной нагрузки и от распространения резистентных к инсектицидам особей, как показано, в частности, в широком популяционном исследовании белокрылки [6].

Однако, представлено очень мало информации о формировании микробиома насекомых, в особенности – фитофагов, растпространении бактерий и их роли во взаимодействии с растением-хозяином. В связи с этим целью данной работы было получение маркированного геном зеленого флуоресцентного белка GFP штамма *Enterobacter* spp, кишечного симбионта колорадского жука из популяции Южного урала.

Существуют различные методы маркирования бактерий, основанные на привнесении в геном клеток исследуемого штамма генов белков, которые можно детектировать тем или иным способом. Клетки бактерий, несущие гены *lacZ*, *gusA*, *celA*, *luc* и *luxAB*, в присутствии соответствующего субстрата можно обнаружить по окрашиванию или люминесценции колоний [7], но необходимость использования дорогостоящих субстратов ограничивает применение этих методов в экспериментах с большим количеством образцов. В настоящее время наиболее удобными и эффективными прижизненными маркерами считаются гены флуоресцентных белков. Чаще всего применяются гены зеленого и красного флуоресцентных белков – GFP и RFP соответственно.

Существуют два основных способа маркирования бактериальных клеток – экспрессия гена флуоресцентного белка в составе плазмиды и встраивание маркерного гена в хромосому при помощи транспозона, обычно Tn5. Оба варианта имеют свои преимущества и недостатки. Преимущество хромосомной экспрессии – стабильность, к недостаткам относятся однокопийность встраиваемого гена, невысокий уровень продукции целевого белка, а также случайность встраивания в геном, что может привести к мутациям, изменяющим характеристики изучаемого штамма. Плазмидная экспрессия лишена подобных недостатков, но не исключена вероятность случайной элиминации введенной конструкции в отсутствие селектирующего маркера, что приводит к нестабильному маркированию клеток [8].

Для создания флуоресцирующего штамма *Enterobacter* использовалась плазмидар JN105TurboGFP [8]. Для получения электрокомпетентных клеток в течение 2 суток наращивали жидкую культуру *Enterobacters pp* в среде TY до концентрации  $10^9$  клеток на 1 мл. После этого культуру клеток разливали в стерильные центрифужные пробирки и охлаждали на снегу. Затем клетки осаждали на центрифуге и четырехкратно промывали осадок 10% стерильным глицерином, после чего суспендировали в стерильном и охлажденном 1M сорбитоле, с последующей расфасовкой по 50 мкл и хранили в морозильной камере при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Электропорацию проводили на электропораторе фирмы Bio-Rad модели Micropulser. После разморозки клеток в пробирки вносили 0.5–1 мкл раствора плазмиды, перемешивали и переносили эту смесь в охлажденные кюветы, потом, выбирая соответствующий режим электропорации, пропускали электрический ток через кювету. После этого смесь клеток и ДНК смывали питательной средой LB, и в стерильном эппендорфе подрачивали в течение 2–3 часов. После инкубации суспензию клеток осаждали непродолжительным центрифугированием. После чего бактерии рассеивали на 1.5% агаризованной среде LB с селективным антибиотиком (гентамицин). Чашки с трансформированными энтеробактериями наращивали в течение 2-х суток при  $28^{\circ}\text{C}$ . Флуоресценцию наблюдали при помощи микроскопа BiozeroBZ-X700 (“Keyence”, Japan) с использованием стандартного фильтра.

Часть имаго колорадских жуков в течение 5 дней получали раствор содержащий 0.03% тетрациклина и 0.03% нистатина, часть – воду без антибиотиков. Затем все особи получили 100 мг пробирочных растений картофеля сорта Ранняя Роза, предварительно погруженных в суспензию бактерий *Enterobacter* GFP  $10^{*9}$ кл/мл. Через 24 часа состав микрофлоры эндосимбионтов определяли по числу КОЕ микроорганизмов в кишечнике имаго и личинок колорадского жука через 24 часа после кормления экспериментальными растениями картофеля. Для этого в асептических условиях кишечник извлекался и промывался физиологическим раствором. Затем образцы гомогенизировались с использованием стерильных пестиков в пробирках типа Эппендорф (SSI, США) и число бактериальных КОЕ определяли по стандартной методике. Флуоресцирующие колонии маркировались при наблюдении в ультрафиолетовом свете.

Согласно описанной выше методике был получен штамм *Enterobacter* GFP, несущий плазмиду pJN105TurboGFP с интегрированным геном, кодирующим флуоресцентный белок (рис. 1). С использованием микроскопа Biozero BZ-X700 показана флуоресценция прошедших селекцию на средах с антибиотиками колоний микроорганизмов (рис. 2а). После выделения плазмидной ДНК была проведена ПЦР амплификация с использованием специфических праймеров к участку гена, кодирующего флуоресцентный белок (рис. 2б) и показано наличие ДНК целевого гена в клетках после селекции.

Показано, что через 24 часа после кормления имаго колорадского жука растениями картофеля, предварительно обработанными *Enterobacter* GFP, жизнеспособные флуоресцентные клетки обнаруживались в кишечнике как получавших антибиотики особей, так и не получавших (рис. 3) приблизительно в равном количестве и КОЕ/особь, соответственно.

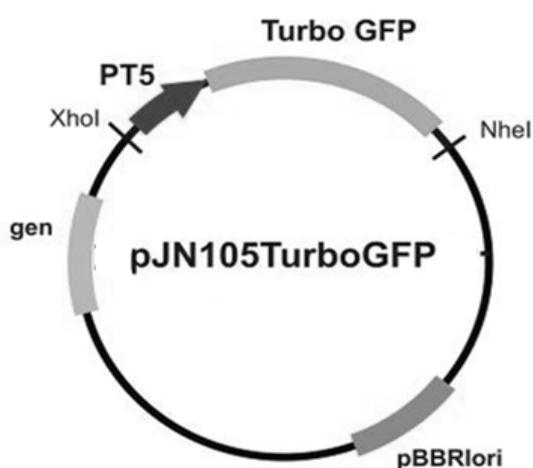


Рис. 1. Схема векторной конструкции pJN105TurboGFP.gen – ген гентамицин-ацетилтрансферазы, PT5 – промотор фага T5, Turbo GFP – ген флуоресцентного белка, XhoI, NheI – сайты рестрикции, pBBR1ori – репликационная плазмида широкого круга хозяев pBBR.

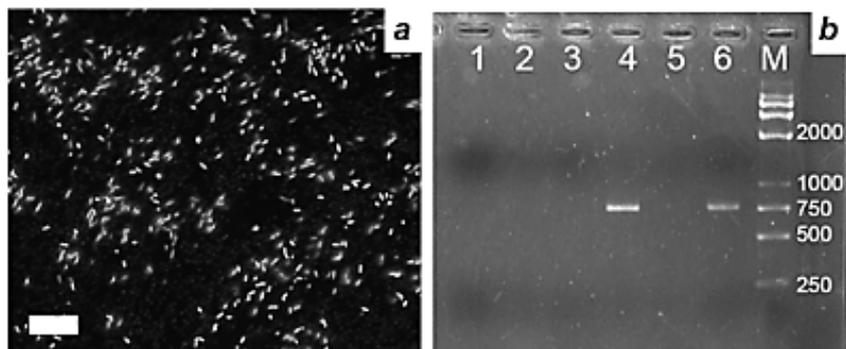


Рис. 2. Меченые флуоресцентным белком бактерии *Enterobacter GFP* (А) и визуализация продуктов ПЦР со специфичными праймерами к данному гену (1 – отрицательный контроль, 2, 3 – *Enterobacter spp* не подвергавшиеся трансформации, 4, 6 – бактерии прошедшие селекцию после трансформации плазмидой с GFP, 5 – бактерии, трансформированные «пустой» плазмидой).

Таблица 1. Содержание жизнеспособных бактерий *Enterobacter spp* исходного и трансформированного штаммов в кишечнике колорадского жука через 24 часа после кормления

|                         | КОЕ/особь * 10 <sup>2</sup> |                      |
|-------------------------|-----------------------------|----------------------|
|                         | вода                        | Раствор антибиотиков |
| <i>Enterobacter spp</i> | 110                         | 12.8                 |
| <i>Enterobacter GFP</i> | 0.1                         | 0.3                  |

Таким образом, полученный штамм флуоресцентных микроорганизмов способен к существованию в кишечнике хозяина исходного штамма и пригоден для дальнейших экспериментов.

Работа выполнена в рамках Госзадания № 116020350027-7 (2016-2018) при частичной финансовой поддержке РФФИ № 18-34-0021 мол\_а.

## Литература

1. Andersen S. B., Hansen L. H., Sapountzis P. et al. Specificity and stability of the *Acromyrmex-Pseudonocardia* symbiosis // *Mol. Ecol.* 2013. V. 22. №16. P. 4307–4321. Шека Е. Ф., В. А. Заец. Радикальная природа фуллерена и его химическая активность // *Журнал физической химии.* 2005. Т. 79. С. 2250–2256.
2. Kenyon S. G., Hunter M. S. Manipulation of oviposition choice of parasitoid wasp, *Encarsia pergandiella*, by endosymbiotic bacterium *Cardinium* // *J. Evol. Biol.* 2007. V. 20. P. 707–716.
3. Krawczyk K., Szymanczyk M., Obrepalska-Stepelowska A. Prevalence of endosymbionts in polish populations of *Leptinotarsa decemlineata* // *J. Insect Sci.* 2015. V. 15. doi: 10.1093/jisesa/iev085.

4. Muratoglu H., Demirbag Z., Sezen K. The first investigation of the diversity of bacteria associated with *Leptinotarsadecemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) // *Biologia*. 2011. V. 66. P. 288–293.
5. Максимов И. В., Сорокань А. В., Нафикова А. Р., Беньковская Г. В. Совместное применение на растениях картофеля бактерии *Bacillus subtilis* 26Д и гифомицета *Beauveria bassiana* Уфа-2 снижает пораженность фитофторозом и выживаемость колорадского жука // *Микол. фитопатол.* 2015. Т. 49. Вып. 5. С. 317–324.
6. Gauthier N., Clouet C., Perrakis A. et al. Genetic structure of Bemisia tabaci Med populations from home-range countries, inferred by nuclear and cytoplasmic markers: impact on the distribution of the insecticide resistance genes // *Pest. Manag. Sci.* 2014. V. 70. P. 1477–1491.
7. Streit W., Kosh K., Werner D. Nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum bv. vaseoli* and *Rhizobium tropici* strains measured by glucuronidase (gus) gene fusion. *Biol. Fertility Soil.* 1992. N 14. P. 140–144.
8. Баймиев А. Х., Ямиданов Р. С., Матниязов Р. Т., Благова Д. К., Баймиев А. Х., Чемерис А. В. Получение Флуоресцентно меченых штаммов клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых для детекции *in vivo* и *in vitro* // *Молекулярная биология*. 2011. №6. С. 984–99.

## **Enterobacter spp, microsymbiont of Colorado potato beetle expressing a gene of gfp protein is useful for study the interaction in the system of the host-plant-phytophage**

D. K. Blagova\*, A. V. Sorokan, V. G. Benkovskaya

*Institute of biochemistry and genetics of the Ufa Federal research center  
of the Russian Academy of Sciences  
71 Oktyabrya Prospekt, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

*\*Email: fortyanns@googlegmail.com*

To assess the role of microsymbionts of Colorado potato beetle in interaction with the potato plant, the proposed line of *Enterobacter* spp expressing glowing protein gfp. The Protocol of recombinant production and beetle treatment are described.

**Keywords:** Colorado potato beetle, microsymbionts, *Enterobacter*, GFP.