

**Микросимбионт колорадского жука  
*Enterobacter* spp экспрессирующий ген gfr-  
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  
e-mail:fourtyanns@googlegmail.com**



# МИКРОСИМБИОНТЫ НАСЕКОМЫХ

Присутствие микросимбионтов в организме животных, в том числе насекомых, и их участие в жизнедеятельности хозяев изучается на протяжении многих лет. Состав симбионтов 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, на Южном Урале содержит бактерии родов *Acinetobacter* и *Enterobacter*.

Однако, представлено очень мало информации о формировании микробиома насекомые, в особенности – фитофагов, распространении 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.

# ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММА ENTEROBACTER GFP

- Для создания флуоресцирующего штамма *Enterobacter* использовалась плазмида pJN105TurboGFP [8]. Для получения электрокомпетентных клеток в течение 2 суток наращивали жидкую культуру *Enterobacter* spp в среде TY до концентрации  $10^9$  клеток на 1 мл. Электропорацию проводили на электропораторе фирмы Bio-Rad модели Micropulser. После разморозки клеток в пробирки вносили 0.5-1 мкл раствора плазмиды. После инкубации суспензию клеток осаждали непродолжительным центрифугированием. После чего бактерии рассеивали на 1,5% агаризованной среде LB с селективным антибиотиком (гентамицин). Флуоресценцию наблюдали при помощи микроскопа Biozero BZ-X700 ("Keyence", Japan) с использованием стандартного фильтра.

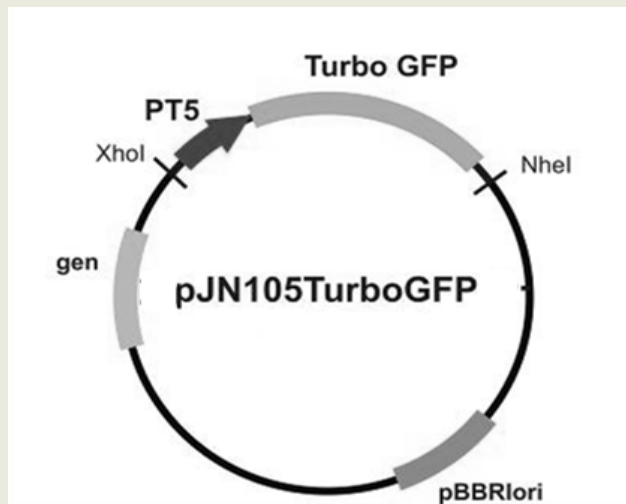
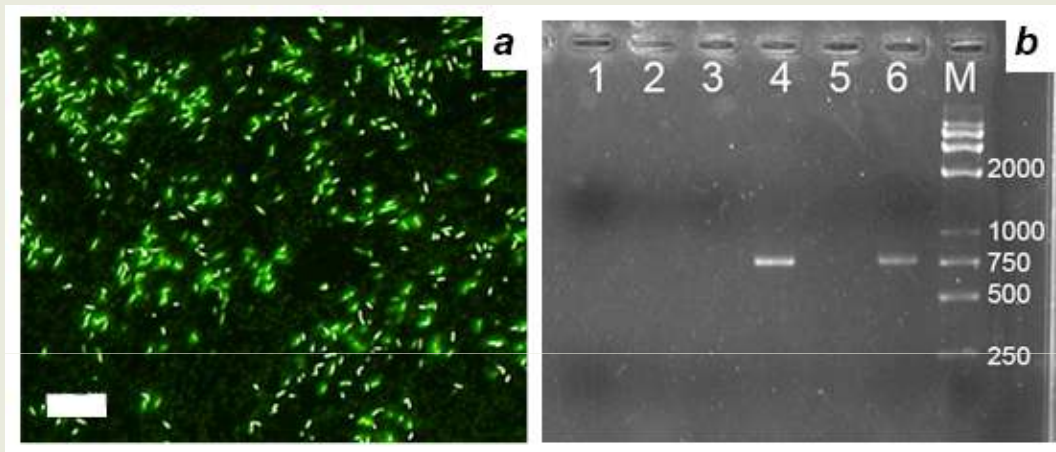


Схема векторной конструкции pJN105TurboGFP. gen – ген гентамицин-ацетилтрансферазы, PT5 – промотор фага T5, Turbo GFP – ген флуоресцентного белка, XhoI, NheI – сайты рестрикции, pBBR1ori – репликон плазмиды широкого круга хозяев pBBR

# МЕЧЕННЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ БЕЛКОМ БАКТЕРИИ ENTEROBACTER GFP



Флуоресценция клеток *Enterobacter* GFP (A) и визуализация продуктов ПЦР со специфичными праймерами к данному гену

(1 – отрицательный контроль, 2,3 – *Enterobacter* sp не подвергавшиеся трансформации, 4,6 – бактерии прошедшие селекцию после трансформации плазмидой с GFP, 5 – бактерии, трансформированные «пустой» плазмидой).

# ФОРМИРОВАНИЕ СИМБИОЗА ENTEROBACTER GFP С КОЛОРАДСКИМ ЖУКОМ

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

	КОЕ/особь *10 <sup>2</sup>	
	вода	Раствор антибиотиков
<i>Enterobacter</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.