

УДК 575.17.+591.557:595.773.4

С. В. СЕРГА, С. В. ДЕМИДОВ, І. А. КОЗЕРЕЦЬКА

ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська 64, Київ, Україна, 01601

ЕНДОСИМБІОТИЧНІ БАКТЕРІЇ *WOLBACHIA* ТА КІЛЬКІСТЬ ОВАРІОЛ У САМОК *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Бактерії роду *Wolbachia* – це ендосимбіотичні альфа-протеобактерії, які передаються здебільшого трансваріально та інфікують велику кількість видів безхребетних. Успіх бактерій у природних популяціях видів-живителів зазвичай пояснюється впливом *Wolbachia* на репродукцію або пристосованість інфікованих особин. *Wolbachia* інфікують популяції *Drosophila melanogaster* по всьому світі, однак однозначної відповіді на питання про вплив бактерій на пристосованість чи репродукцію плодової мушки до сих пір не отримано. У даній роботі вперше оцінюється вплив *Wolbachia* на такий важливий кількісний показник репродуктивної здатності як кількість оваріол у яєчниках, що може впливати на кількість нащадків, а отже, і поширення бактерій у популяціях. Встановлено, що інфікування *Wolbachia* генотипів wMel та wMelCS призводить до збільшення кількості оваріол приблизно в 2 рази в ізосамкових лініях, започаткованих самками з природної популяції дрозофіли Умані.

Ключові слова: *Wolbachia*, *Drosophila melanogaster*, кількість оваріол, Умань

Вступ. Бактерії роду *Wolbachia* – це ендосимбіотичні альфа-протеобактерії, які передаються здебільшого трансваріально та інфікують велику кількість видів безхребетних. [1, 2]. У більшості випадків успіх бактерій у популяції пояснюється впливом на репродукцію виду-живителя. *Wolbachia* здатні викликати модифікації статевого розмноження, такі як цитоплазматична несумісність, андроцид, фемінізація генетичних самців і перехід до партеногенезу [3]. Тип репродуктивних модифікацій та особливості впливу бактерій залежать як від штаму *Wolbachia*, так і від генотипу живителя [4].

Wolbachia ідентифіковані у низки видів дрозофілід [5] та викликають в їх представників цитоплазматичну несумісність або андроцид, що можуть обумовлювати високі частоти інфікування імаго [6]. Так, у популяціях *Drosophila simulans*, інфікованих штамом wRi, для якого характерні високі рівні цитоплазматичної несумісності, зазвичай частота інфікування складає 98-100% [7]. Проте не у всіх видів дрозофіл спостерігаються високі рівні цитоплазматичної несумісності або андроцид. Для таких штамів як wMel (інфікує *Drosophila melanogaster*) та wSuz (інфікує *Drosophila sukuzii*) характерні низькі рівні цитоплазматичної несумісності та варіабельні частоти інфікування представників природних популяцій [8, 9, 10]. У таких випадках підтримання бактерій у популяції зазвичай пояснюють впливом *Wolbachia* на пристосованість інфікованих особин [3, 6].

Причини успіху *Wolbachia* в природних популяціях, інфікованих такими штамми бактерій, не завжди вдається виявити однозначно [11, 12]. Так, в роботі Фрай та співавторів (2004) було показано, що ефекти інфікування *Wolbachia* залежать від лінії *D. melanogaster*. У частини ліній інфікування *Wolbachia* обумовлює підвищення виживання або фекандильності, у частини – навпаки. Подібні неоднозначні результати зустрічаються і в інших роботах, що стосуються аналізу параметрів пристосованості дрозофіл [13, 14, 15, 16]. Отже, питання підтримання інфікування *Wolbachia* в природних популяціях *D. melanogaster* залишається відкритим.

Кількість оваріол – це кількісна ознака у комах, яка впливає на репродуктивний успіх [17]. Кількість оваріол впливає на число відкладених яєць у певні періоди життя комах (особливо на початку життя), а отже, і на кількість нащадків [18]. Крім того, ознака характеризується генетичною складовою [19] та клинальністю [18], що вказує на вплив добору на неї. *Wolbachia* інфікують гонади дрозофіл від найперших стадій розвитку, тому можуть потенційно впливати на даний показник. Проте вплив *Wolbachia* на кількість оваріол раніше не

досліджувався, хоча відомі ефекти бактерій на фекандильність дрозофіл [15]. Одним з механізмів підвищення кількості нащадків у інфікованих особин може бути збільшення кількості оваріол. Метою роботи було оцінити вплив *Wolbachia* на кількість оваріол у ізосамкових ліній *D. melanogaster* з природної популяції м. Умань.

Матеріал і методи досліджень

Лінії D. melanogaster та обробка тетрацикліном. У роботі використовувалися ізосамкові лінії дрозофіли (Ум 8-12, Ум 15-12 та Ум 25-12), які були започатковані з представниками природної популяції м. Умань (48°45'45.26"N–30°14'38.97"E) у 2012 році. Ця популяція характеризується інфікуванням двома генотипами *Wolbachia* – wMel та wMelCS [15]. Лінія Ум 8-12 інфікована генотипом wMel, лінія Ум 25-12 – генотипом wMelCS, а лінія Ум 15-12 – не інфікована бактерією.

Для отримання генетично ідентичних інфікованих та неінфікованих ліній ми застосували обробку антибіотиком. Для цього всі лінії утримували на середовищі з додаванням антибіотика тетрацикліну у концентрації 0,25 мг/мл протягом двох поколінь. Для усунення можливих ефектів антибіотика на досліджувану ознаку, лінії утримувались на стандартному середовищі (на 1 літр води 6 г агару, 15 г дріжджів, 50 г цукру, 55 г манної крупи) протягом двох поколінь до початку експериментів [12]. Після цього лінії перевірялись на наявність *Wolbachia* методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Неінфіковану лінію Ум 15-12 брали у експеримент для контролю можливих ефектів антибіотика на показник.

Виявлення та типування Wolbachia. Виділення ДНК проводили з 10-15 особин кожної лінії методом висолювання білків [20]. Наявність *Wolbachia* визначали методом ПЛР з використанням праймерів, специфічних до генів *16S rRNA* [21] та *wsp* [22]. Кожну реакцію проводили двічі.

Генотипування *Wolbachia* проводили методом ПЛР за кількістю мінісателітних повторів VNTR-141, VNTR-105 та наявністю інсерції елемента IS5 у локусах WD0516/7 та WD1310 як описано у Ріглер та ін. (2005) [23].

Оцінка кількості оваріол. Мухи усіх ліній розсаджували у пробірки по 5 самок та 2 самці на 6 годин для відкладання яєць. Після 6 годин їх витрушували з пробірок та отримували нащадків з нанесених яєць, контролюючи кількість личинок на рівні приблизно 50 штук на пробірку. Отриманих нащадків (самок) відбирали та утримували до віку 7 діб. Після цього самок розрізали та візуально аналізували кількість оваріол під стереомікроскопом. Кількість оваріол підраховувалася як сума кількості оваріол у кожному яєчнику. Кількість оваріол у різних лініях порівнювали за допомогою критерію Манна-Вітні [24].

Результати досліджень та їх обговорення

У дослідження були обрані ізосамкові лінії *D. melanogaster*, які інфіковані різними генотипами *Wolbachia*, а саме wMel та wMelCS. Відомо, що дані генотипи характеризуються різним впливом на фекандильність дрозофіли. Мухи, інфіковані генотипом wMel, несуть достовірно більшу кількість яєць, ніж інфіковані генотипом wMelCS або неінфіковані [15]. Результати аналізу кількості оваріол у досліджених ліній на стандартному середовищі та на середовищі з додаванням антибіотика наведено у таблиці.

Таблиця

Кількість оваріол у самок з ізосамкових ліній, інфікованих різними генотипами *Wolbachia*

Лінія	Статус інфікування	Стандартне середовище	Середовище з тетрацикліном	U	p
Ум 25-12	wMelCS	21±3,9	9,9±1	4	p<0,01
Ум 8-12	wMel	31,3±1,5	18,2±3	2	p<0,01
Ум 15-12	Не інфікована	12,3±1,5	12,3±0,9	16	p>0,05

Примітки: U – значення критерію Манна-Вітні отримані при порівнянні кількості оваріол у самок на стандартному середовищі та самок, які лікували тетрацикліном

Як свідчать результати, наведені в таблиці, самки, інфіковані будь-яким генотипом *Wolbachia*, характеризуються достовірно більшою кількістю оваріол порівняно з самками того ж генотипу, але неінфікованими бактерією. Самки лінії Ум 8-12 характеризуються більшою кількістю оваріол у порівнянні з самками лінії Ум 25-12 ($U=6$, $p \leq 0,05$), проте різниця на межі достовірності. Відмінність у кількості оваріол у цих ліній може обумовлюватись як генетичними особливостями ліній, так і генотипами *Wolbachia*.

Отриманий результат є першим кроком у розумінні механізмів впливу *Wolbachia* на фекандильність *D.melanogaster*. І хоча кількість оваріол не завжди однозначно корелює з підвищенням кількості нащадків [18], однією з причин більшої плодючості інфікованих *Wolbachia* особин може бути саме вплив бактерій на кількість оваріол у яєчниках. Цікаво, що інфікування двома генотипами, які характеризуються різними впливами на фекандильність, призводить до однакового ефекту. Хоча у даному випадку потребується аналіз фекандильності разом з кількістю оваріол у одних і тих самих ліній, а також аналіз фекандильності у різні періоди життя мух.

Висновок

Наявність бактерій *Wolbachia* генотипів wMel та wMelCS призводить до збільшення кількості оваріол у інфікованих самок *Drosophila melanogaster* приблизно в 2 рази.

1. Werren J.H. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology/ J.H. Werren, L. Baldo, M.E. Clark // Nat. Rev. Microbiol. — 2008. — Vol. 6. — P. 741—751. DOI 10.1038/nrmicro1969.
2. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone / O. Duron, D. Bouchon, S. Boutin [et al.] // BMC Biology. — 2008. — Vol. 6, № 27. - doi: 10.1186/1741-7007-6-27.
3. O'Neill S.L. Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction / S.L. O'Neill, A.A. Hoffmann, J.H. Werren // Oxford University Press., 1997. — 214 p.
4. Loss of reproductive parasitism following transfer of malekilling *Wolbachia* to *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* / Z. Veneti , S. Zabalou, G. Papafotiou [et al.] // Heredity. — 2012. — Vol. 109. P. 306—312.
5. Heritable endosymbionts of *Drosophila* / M. Mateos, S.J. Castrezana, B.J. Nankivell [et al.] // Genetics. — 2006. — Vol. 174. — P. 363—376.
6. Серга С. Загадка распространения *Wolbachia* в природных популяциях *Drosophila melanogaster* / Светлана Серга, Ирина Козерецкая // Журнал общей биологии. — 2013. — Т. 74, № 2. — С.99—111.
7. Ballard J.W.O. Sequential evolution of a symbiont inferred from the host: *Wolbachia* and *Drosophila simulans* / J. W.O Ballard // Molecular Biology and Evolution. — 2004. — Vol. 21, № 3. — P. 428—442.
8. Hoffmann A.A. Partial cytoplasmic incompatibility between two Australian populations of *Drosophila melanogaster* / A.A. Hoffmann // Entomologia Experimentalis et Applicata. — 1988. — Vol. 48. — P. 61—67.
9. Solignac M. Widespread occurrence of the proteobacteria *Wolbachia* and partial cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster* / M. Solignac, D. Vautrin, F. Rousset // Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. — 1994. — Vol. 317. — P. 461—470.
10. *Wolbachia* do not live by reproductive manipulation alone: infection polymorphism in *Drosophila suzukii* and *D. subpulchrella* / C.A. Hamm, D.J. Begun, A. Vo [et al.] // Molecular Ecology. — 2014. — Vol. 23. — P. 4871—4885.
11. Harcombe W. *Wolbachia* effects in *Drosophila melanogaster*: in search of fitness benefits / W. Harcombe, A.A. Hoffmann // Journal of Invertebrate Pathology. — 2004. — Vol. 87. — P. 45—50.
12. Fry A.J. Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster* / Fry A.J., M.R. Palmer, D.M. Rand // Heredity. — 2004. — Vol. 93. — P. 379—389.
13. *Drosophila melanogaster* inhabiting northern regions of European Russia are infected with *Wolbachia* which adversely affects their life span / N.V. Roshina, A.V. Symonenko, A.V. Kremetsova [et al.] // Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii=Vavilov Journal of Genetics and Breeding. — 2018. — Vol. 22, № 5. — P. 568573. DOI 10.18699/VJ18.396.
14. Removing endosymbiotic *Wolbachia* specifically decreases lifespan of females and competitiveness in a laboratory strain of *Drosophila melanogaster*/ I.D. Alexandrov, M. V. Alexandrova, I.I. Goryacheva [et al.]// Russ J Genet. — 2007. — Vol. 43. — P. 1147—1152.
15. Fecundity as one of possible factors contributing to the dominance of the wMel genotype of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila melanogaster* / S. Serga, O. Maistrenko, A. Rozhok [et al.]// Symbiosis. - 2014. — Vol. 63, № 1. — P. 11—17. doi: 10.1007/s13199-014-0283-1.

16. *Should* symbionts be nice or selfish? Antiviral effects of *Wolbachia* are costly but reproductive parasitism is not / J. Martinez, S. Ok, S. Smith [et al.] // PLOS Pathog. — 2015. — Vol. 11. — P. e1005021.
17. *Reproductive* and post-reproductive life history of wild-caught *Drosophila melanogaster* under laboratory conditions / P. Klepsatel, M. Galikova, N. De Maio [et al.] // J. Evol. Biol. — 2013. — Vol. 26. — P. 1508—1520.
18. *Geographic* variation in diapause incidence, life-history traits, and climatic adaptation in *Drosophila melanogaster* / P. S. Schmidt, L. Matzkin, M. Ippolito, W. F. Eanes. // Evolution. — 2005. — Vol. 59. — P. 1721—1732.
19. *Quantitative* trait loci affecting phenotypic plasticity and the allometric relationship of ovariole number and thorax length in *Drosophila melanogaster* / A.O. Bergland, A. Genissel, S. V. Nuzhdin, M. Tatar // Genetics. — 2008. — Vol. 180. — P. 567—582.
20. *Aljanabi S.* Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques/ S. Aljanabi // Nucleic Acids Res. — 1997. — Vol. 25, № 22. — P. 4692—4693. doi:10.1093/nar/25.22.4692
21. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects / S.L. O'Neill, R. Giordano, A.M.E. Colbert [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. — 1992. — Vol. 89. — P. 2699—2702.
22. *Zhou W.* Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences / W. Zhou, F. Rousset, S. O'Neil // Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences. — 1998. — Vol. 265. — P. 509—515.
23. *Evidence* for global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster* / M. Riegler, M. Sidhu, W.J. Miller, S.L. O'Neill // Current Biology. — 2005. — Vol. 15. — P. 1428—1433.
24. *Атраментова Л.О.* Статистичні методи в біології: Підручник / Л.О. Атраментова, О. Утевська. — Х.: ХНУ імені В.Н. Каразіна, 2007. — 288 с.

S. V. Serga, S. V. Demidov, I. A. Kozeretska

ESC «The Institute of Biology and Medicine» Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

ENDOSYMBIOTIC BACTERIA *WOLBACHIA* AND OVARIOLE NUMBER IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* FEMALES

Wolbachia are endosymbiotic alpha-proteobacteria, predominantly transmitted transovarially and infect a large number of invertebrates. The success of infection with these bacteria in natural populations of host species can be explained by the influence of *Wolbachia* on reproduction or fitness of infected individuals. *Wolbachia* infect *Drosophila melanogaster* populations worldwide, although the univocal effect of bacteria on the fitness or reproduction of the fruit fly has not been identified. In this work, we first estimated the effect of *Wolbachia* on such an important quantitative indicator of reproduction success as the ovariole number in the ovaries, which can affect the number of offspring, and therefore the spread of bacteria in the host population. In this study were involved two isofemale lines of *D. melanogaster*, which are infected with various *Wolbachia* genotypes, namely *wMel* and *wMelCS*. It is known that these genotypes have different effects on the fecundity of *Drosophila*. To obtain genetically identical infected and uninfected lines, we applied antibiotic treatment. The ovariole number was compared in lines maintained on a standard medium and those that were grown on the medium supplemented with an antibiotic tetracycline. We found that *Wolbachia* infection of the *wMel* and *wMelCS* genotypes causes an approximately 2-fold increase in the ovariole number in the isofemale lines from the Uman population.

Key words: *Wolbachia*, *Drosophila melanogaster*, ovariole number, Uman

Рекомендує до друку

Н. М. Дробик

Надійшла 30.11.2018