

УДК 575.22:595.779.4:591.557

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ СИМБИОТИЧЕСКОЙ БАКТЕРИИ *WOLBACHIA* В ПОПУЛЯЦИИ *DROSOPHILA MELANOGASTER* Г. НАЛЬЧИК

© 2014 г. Р.А. Быков¹, Ю.Ю. Илинский^{1,2}, М.А. Волошина^{1,2}, И.К. Захаров^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: bykovra@bionet.nsc.ru;

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет

Поступила в редакцию 12 ноября 2013 г. Принята к публикации 22 декабря 2013 г.

Симбиотическая бактерия *Wolbachia* широко распространена в природных популяциях *Drosophila melanogaster*. Частота встречаемости этой бактерии в популяциях *D. melanogaster* разных регионов может варьировать в широких пределах – от единичных особей до тотальной зараженности. Генотипическое разнообразие симбионта включает 6 генотипов: wMel, wMel2, wMel3, wMel4, wMelCS, wMelCS2. Повсеместно встречаются 2 генотипа *Wolbachia* – wMel и wMelCS, остальные относятся к редким генотипам, либо распространенным на ограниченной территории, либо встречающимся только в лабораторных линиях. Несмотря на уже проведенные исследования распространенности *Wolbachia* в популяциях *D. melanogaster* мира, имеется недостаточно данных о распространенности и генотипическом разнообразии этой бактерии в популяциях Евразии. В данном исследовании проведен анализ распространенности и генотипического разнообразия *Wolbachia* в природной популяции *D. melanogaster* г. Нальчик (Кабардино-Балкария). Показано, что генотипический состав *Wolbachia* и частота ее встречаемости в популяции на протяжении 4 лет стабильны. Генотипический состав *Wolbachia* характеризуется наличием двух генотипов, wMel и wMelCS, из которых наиболее представлен wMel. Нами не было обнаружено других генотипов *Wolbachia* в популяции *D. melanogaster* г. Нальчик.

Ключевые слова: *Wolbachia*, *Drosophila melanogaster*, генотип, популяции.

ВВЕДЕНИЕ

Симбиотическая бактерия *Wolbachia* – матерински наследуемый внутриклеточный микроорганизм, широко распространенный в популяциях различных членистоногих, а также встречающийся у некоторых видов нематод (Werren *et al.*, 1995; Hilgenboecker *et al.*, 2008; Zug, Hammerstein, 2012). Биологическое влияние бактерии на организм вида-хозяина крайне разнообразно и может выражаться в форме как мутуализма, так и паразитизма. По данным исследований от 40 до 70 % всего видового разнообразия современных членистоногих может быть инфицировано *Wolbachia* (Hilgenboecker *et al.*, 2008; Zug, Hammerstein, 2012).

Для рода *Drosophila* на апрель 2014 г. описано более 50 симбиотических ассоциаций *Drosophila* sp. – *Wolbachia* (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>, <http://www.taxodros.uzh.ch/>). Одной из наиболее изученных симбиотических систем является система *D. melanogaster*–*Wolbachia*. Эндосимбионт *Wolbachia* распространен в популяциях *D. melanogaster* по всему миру. Частота встречаемости бактерии может варьировать в широких пределах: от единичных инфицированных особей до полностью зараженных популяций, однако в среднем она составляет около 50 % (Hoffmann *et al.*, 1994, 1998; Solignac *et al.*, 1994; Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский, 2008; Nunes *et al.*, 2008; Verspoor, Haddrill, 2011; Richardson *et al.*, 2012; Ilinsky, 2013).

Генотипическое разнообразие *Wolbachia* у *D. melanogaster* описывается на основании данных по полиморфизму генома бактерии. К настоящему моменту для этого вида описано 6 генотипов *Wolbachia*: wMel, wMelCS, wMelCS2, wMel2, wMel3 и wMel4. Эти генотипы отличаются между собой различными перестройками генома: встройкой мобильных элементов, инверсией участка генома и количеством повторов минисателлитных локусов (Riegler *et al.*, 2005, 2012; Ilinsky, 2013).

Наиболее распространена в природных популяциях *D. melanogaster* *Wolbachia* генотипа wMel, частота встречаемости которого среди инфицированных особей достигает 100%. Генотип wMelCS также распространен в популяциях *D. melanogaster* по всему миру, однако частота встречаемости особей, несущих бактерию этого генотипа, очень низкая (Riegler *et al.*, 2005; Илинский, Захаров, 2007а, б; Nunes *et al.*, 2008; Richardson *et al.*, 2012; Ilinsky, 2013).

Генотип wMelCS2 характерен для восточноевропейских, среднеазиатских и алтайских популяций *D. melanogaster*, а также для популяций Кавказа (Riegler *et al.*, 2005; Илинский, Захаров 2007а, б; Ilinsky, 2013). Генотип wMel2 обнаруживается в популяциях Юго-Восточной Азии (Riegler *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2008). *Wolbachia* генотипа wMel4 была обнаружена в популяции *D. melanogaster* на полуострове Синай (Ilinsky, 2013). Генотип wMel3 был зафиксирован в единственной лабораторной линии *D. melanogaster* в Швеции и, скорее всего, не встречается в природных популяциях (Riegler *et al.*, 2005).

В данной работе проведено исследование распространенности и генетического разнообразия *Wolbachia* в природной популяции *D. melanogaster* г. Нальчик (Кабардино-Балкария, Россия). Показана стабильность поддержания инфицированности популяции в течение 4 лет на уровне около 66%. Показано, что среди инфицированных особей преобладают носители *Wolbachia* генотипа wMel. Также был обнаружен генотип *Wolbachia* wMelCS2, ранее не замеченный в популяции исследуемого региона. Полученные данные дополняют общую картину по распространенности генотипов *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster* мира.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии *Drosophila melanogaster*

Сбор *D. melanogaster* проводился в начале сезона массового размножения (июнь) в районе частного сектора г. Нальчик с большим количеством фруктовых деревьев. От каждой оплодотворенной в природе самки было получено потомство, которое в дальнейшем велось как изосамочья линия. Поскольку *Wolbachia* наследуется по материнскому типу, то каждая изосамочья линия характеризовала статус инфицированности самки-основательницы. Всего в исследовании использовались 254 изосамочки линии *D. melanogaster*, созданные на основе сборов из природной популяции г. Нальчик (Кабардино-Балкария) за 3 года: 2010 (85 изосамочьих линий), 2012 (103) и 2013 (66).

Выделение ДНК

Для выделения ДНК использовалась стандартная методика (Marmur, 1961) с модификациями. Из каждой линии в анализ брали 2–3 самки. Гомогенизация проводилась в 200 мкл экстрагирующего буфера (10 mM TRIS-HCl (pH 8,0), 25 mM ЭДТА, 0,5 % SDS, 0,1 M NaCl) с последующей инкубацией при 56 °C в течение 1 часа. Растворение ДНК после преципитации проводилось в 50 мкл бидистиллированной воды. Выделенная ДНК хранилась при –20 °C.

Определение статуса инфицированности

Для определения статуса инфицированности каждой линии использовался метод ПЦР с праймерами, специфичными к гену *Wolbachia* *wsp* 81F 5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3', 691R 5'-AAAAATTAACGCTACTCCA-3' (Zhou *et al.*, 1998). Определение генотипа *Wolbachia* проводилось с использованием праймеров, специфичных к полиморфным маркерам генома бактерии: двум локусам встройки инсерционной последовательности IS5 IS5-WD0516/7: F 5'-CCATCAAGGTCTCTTTCA-3', R 5'-TGCAAGGAAAАСТААССАG-3'; IS5-WD1310: F 5'-AGGAGAACTGGTCTACGC-3', R 5'-TGTTGCTGAGCTTTGCT-3', двум минисателлитным повторам VNTR (VNTR-141:

F 5'-GGAGTATTATTGATATGCG-3', R 5'-GACTAAAGGTTAGTTGCAT-3'; VNTR-105: F 5'-GCAATTGAAAATGTGGTGCC-3', R 5'-ATGACACCTTACTTAACCGTC-3') и инверсии в локусе WD0394-WD0541 F 5'-AAGTCTGT-CACGGTTGAG-3', R 5'-GTAAAAGATGCAG-TAAAGG-3' (Riegler *et al.*, 2005). Визуализация образцов проводилась посредством электрофореза в 1,5 %-м агарозном геле.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Инфицированность популяции

Анализ инфицированности внутриклеточной бактерией *Wolbachia* проведен для 254 линий *D. melanogaster* природной популяции г. Нальчик (Кабардино-Балкария) за три года сборов (табл. 1). Инфекция была выявлена во всех исследованных выборках. Наиболее высокий уровень инфицированности в популяции был выявлен для сборов 2010 г. – 72 %, наименьший – для выборки 2012 г. – 59 %. По результатам исследования уровень инфицированности популяции *D. melanogaster* Нальчика за 4 года существенно не изменился, а среднее значение инфицированности популяции составило 66 %.

Разнообразие генотипов *Wolbachia* в популяции *D. melanogaster* г. Нальчик

Анализ генотипического разнообразия *Wolbachia* среди инфицированных линий показал, что почти все они несут бактерию генотипа wMel (99 %), только две линии оказались инфицированы *Wolbachia* редкого генотипа

wMelCS2. Эти линии относятся к выборкам 2012 и 2013 гг. (табл. 2).

Нами не было выявлено ни одного случая инфицированности линии бактерией *Wolbachia* генотипов wMelCS, wMel2, wMel3 или wMel4. Все они относятся к числу редко встречающихся в природе генотипов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования распространенности симбиотической бактерии *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster* мира показали, что бактерия встречается повсеместно со средней частотой инфицированности популяций около 50 % (Hoffmann *et al.*, 1994, 1998; Solignac *et al.*, 1994; Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский, 2008; Verspoor, Haddrill, 2011). Появляются новые данные о распространенности и генотипическом разнообразии *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster* Евразии (Riegler *et al.*, 2005; Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский, 2008; Nunes *et al.*, 2008; Richardson *et al.*, 2012; Ilinsky, 2013). В проведенном исследовании мы оценили степень инфицированности популяции *D. melanogaster* г. Нальчик бактерией *Wolbachia* за 3 года, а также охарактеризовали генотипическое разнообразие симбионта.

Уровень инфицированности популяции *D. melanogaster* Нальчика варьировал от 59 до 72 %. Сопоставляя полученные значения с результатами исследований, проведенных для природных популяций *D. melanogaster* мира (Hoffmann *et al.*, 1994, 1998; Solignac *et al.*, 1994; Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский, 2008; Nunes *et al.*, 2008; Verspoor, Haddrill, 2011; Richardson *et al.*, 2012; Ilinsky, 2013), можно

Таблица 1

Инфицированность эндосимбионтом *Wolbachia* выборок из популяции *D. melanogaster* г. Нальчик

Год сбора	Исследовано линий	Доля инфицированных линий	Доля неинфицированных линий
2010	85	0,72	0,28
2012	103	0,59	0,41
2013	66	0,67	0,33

Таблица 2

Генотипическое разнообразие *Wolbachia* в популяции *D. melanogaster* г. Нальчик

Год сбора	Исследовано инфицированных линий	Генотип <i>Wolbachia</i>		
		wMel	wMelCS2	Другие генотипы
2010	61	61	0	0
2012	61	60	1	0
2013	44	43	1	0

сделать вывод, что этот уровень не отличается от уровня инфицированности, характерного для природных популяций Евразии.

При анализе генотипического состава *Wolbachia* в популяции *D. melanogaster* г. Нальчик были выявлены только 2 из 6 описанных в настоящее время генотипов бактерии – wMel и wMelCS2. Генотип wMelCS2 относится к числу редких генотипов: в более ранних исследованиях показано, что этот генотип *Wolbachia* характерен для восточноевропейских и алтайских популяций *D. melanogaster* (Riegler *et al.*, 2005; Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский, 2008). В этих исследованиях также анализировались выборки из популяции Нальчика, однако они были представлены единичными линиями. Все они оказались инфицированы *Wolbachia*, при этом был обнаружен только один генотип бактерии – wMel (Илинский, 2008). В нашем исследовании задействованы большие выборки, в связи с чем нам удалось зафиксировать редкий генотип wMelCS2. Не исключено, что в популяциях *D. melanogaster* Нальчика имеются особи, несущие *Wolbachia* генотипа wMelCS, который также встречается в некоторых популяциях Кавказа и других ближайших регионов (Riegler *et al.*, 2005; Илинский, Захаров 2007а, б; Ilinsky, 2013).

Работа выполнена при финансовой поддержке по базовому бюджетному проекту № VI.53.1.2 и по гранту РФФИ №12-04-01319а.

ЛИТЕРАТУРА

- Илинский Ю.Ю. Эндосимбионт *Wolbachia* в природных популяциях *Drosophila melanogaster* Северной Евразии: Дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2008. 154 с.
- Илинский Ю.Ю., Захаров И.К. Характеристика инфицированности цитоплазматическим эндосимбионтом *Wolbachia* популяции *Drosophila melanogaster* Умани // Докл. АН. 2007а. Т. 413. № 4. С. 561–563.
- Илинский Ю.Ю., Захаров И.К. Эндосимбионт *Wolbachia* в евразийских популяциях *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2007б. Т. 43. № 7. С. 905–915.
- Hilgenboecker K., Hammerstein P., Schlattmann P., Telschow A., Werren J.H. How many species are infected with *Wolbachia*? – A statistical analysis of current data // FEMS Microbiol. Lett. 2008. V. 281. P. 215–220.
- Hoffmann A.A., Clancy D.J., Merton E. Cytoplasmic incompatibility in Australian populations of *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1994. V. 136. P. 993–999.
- Hoffmann A.A., Hercus M., Dagher H. Population dynamics of the *Wolbachia* infection causing cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1998. V. 148. P. 221–231.
- Ilinsky Y. Coevolution of *Drosophila melanogaster* mtDNA and *Wolbachia* genotypes // PLoS ONE. 2013. V. 8. No. 1. e54373.
- Ilinsky Y., Zakharov I.K. Genetic correlation between types of mtDNA of *Drosophila melanogaster* and genotypes of its primary endosymbiont, *Wolbachia* // Drosophila Inf. Serv. 2006. V. 89. P. 89–91.
- Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms // J. Mol. Biol. 1961. V. 3. P. 208–218.
- Nunes M.D.S., Nolte V., Schlotterer C. Nonrandom *Wolbachia* infection status of *Drosophila melanogaster* strains with different mtDNA haplotypes // Mol. Biol. Evol. 2008. V. 25. No. 11. P. 2493–2498.
- Richardson M.F., Weinert L.A., Welch J.J., Linheiro R.S., Magwire M.M. *et al.* Population genomics of the *Wolbachia* endosymbiont in *Drosophila melanogaster* // PLoS Genet. 2012. V. 8. No. 12. e1003129.
- Riegler M., Sidhu M., Miller W.J., O'Neill S.L. Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster* // Curr. Biol. 2005. V. 15. P. 1428–1433.
- Riegler M., Iturbe-Ormaetxe I., Woolfit M., Miller W.J., O'Neill S.L. Tandem repeat markers as novel diagnostic tools for high resolution fingerprinting of *Wolbachia* // BMC Microbiol. 2012. V. 12. Suppl. 1. S. 12.
- Solignac M., Vautrin D., Rousset F. Widespread occurrence of the proteobacteria *Wolbachia* and partial cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster* // C. R. Acad. Sci. Paris. 1994. V. 317. P. 461–470.
- Verspoor R.L., Haddrill P.R. Genetic diversity, population structure and *Wolbachia* infection status in a worldwide sample of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans* populations // PLoS ONE. 2011. V. 6. No. 10. e26318.
- Werren J.H., Windsor D., Guo L.R. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods // Proc. R. Soc. Lond. B. 1995. V. 262. P. 197–204.
- Zhou W., Rousset F., O'Neill S. Phylogeny and pcr-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences // Proc. Biol. Sci. 1998. V. 265. P. 509–515.
- Zug R., Hammerstein P. Still a host of hosts for *Wolbachia*: Analysis of recent data suggests that 40 % of terrestrial arthropod species are infected // PLoS ONE. 2012. V. 7. No. 6. e38544.

**PREVALENCE AND GENOTYPIC DIVERSITY
OF THE SYMBIOTIC BACTERIUM *WOLBACHIA*
IN THE *DROSOPHILA MELANOGASTER* POPULATION OF NALCHIK**

R.A. Bykov¹, Yu.Yu. Ilinskii^{1,2}, M.A. Voloshina^{1,2}, I.K. Zakharov^{1,2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: bykovra@bionet.nsc.ru;

² Novosibirsk National Research University, Novosibirsk, Russia

The symbiotic bacterium *Wolbachia* is widespread in natural *Drosophila melanogaster* populations. Its frequency in *D. melanogaster* populations is broadly variable from occasional individuals to total infestation. Six genotypes are recognized in this symbiont: wMel, wMel2, wMel3, wMel4, wMelCS, and wMelCS2. Two of them are ubiquitous: wMel and wMelCS. Others occur either in local areas or in laboratory stocks. In spite of the studies of *Wolbachia* occurrence in *D. melanogaster* populations of the world, the information of its prevalence and genotypic diversity in Eurasian populations is still scarce. We analyze the prevalence and genotypic diversity of *Wolbachia* in the natural *D. melanogaster* population of the city of Nalchik. It is shown that the genotypic composition of *Wolbachia* and its frequency in the population have remained stable for four years. Two genotypes are present in the population: wMel and wMelCS, the former being predominant. We found no other *Wolbachia* genotypes in the Nalchik *D. melanogaster* population.

Key words: *Wolbachia*, *Drosophila melanogaster*, genotype, populations.