

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт цитологии и генетики

На правах рукописи

Быков Роман Андреевич

**ДИНАМИКА ИНФИЦИРОВАННОСТИ ПРИРОДНЫХ И
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *DROSOPHILA MELANOGASTER*
РАЗНЫМИ ГЕНОТИПАМИ ЭНДОСИМБИОНТА *WOLBACHIA***

(03.02.07) «генетика»

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель

д.б.н., проф. И.К. Захаров

**Новосибирск
2014**

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Симбиотическая бактерия <i>Wolbachia</i>	13
1.2. Распространенность <i>Wolbachia</i>	14
1.3. Локализация <i>Wolbachia</i> в организме хозяина.....	15
1.4. Репродуктивные аномалии, индуцируемые <i>Wolbachia</i>	15
1.4.1. Феминизация	16
1.4.2. Андрокид.....	16
1.4.3. Партеногенез	17
1.4.4. Цитоплазматическая несовместимость	17
1.4.4.1. Факторы, влияющие на степень проявления ЦН.....	18
1.4.4.2. Механизмы ЦН	20
1.5. Классификация <i>Wolbachia</i>	25
1.6. <i>Wolbachia</i> в популяциях видов-хозяев	27
1.7. <i>Wolbachia</i> у дрозофилид.....	28
1.7.1. Штаммы <i>Wolbachia</i> у <i>Drosophila simulans</i>	28
1.7.2. Цитотипы <i>Drosophila simulans</i>	30
1.7.3. Штаммы <i>Wolbachia</i> у <i>Drosophila melanogaster</i>	31
1.7.4. Цитотипы <i>Drosophila melanogaster</i>	33
1.8. Инфицированность природных популяций <i>D. melanogaster</i> и <i>D. simulans</i> симбиотической бактерией <i>Wolbachia</i>	34
1.9. Распространенность <i>Wolbachia</i> среди лабораторных линий <i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i>	37
1.10. Моделирование динамики инфицированности природных популяций <i>D. simulans</i> и <i>D. melanogaster</i> бактерией <i>Wolbachia</i>	38
1.11. Примеры мутуалистических взаимоотношений бактерии <i>Wolbachia</i> с разными видами.....	40

1.12. Факты мутуалистического взаимодействия в симбиотической системе <i>Wolbachia-Drosophila melanogaster</i>	43
1.13. Другие эндосимбионты <i>Drosophila</i>	46
1.14. Использование <i>Wolbachia</i> в биотехнологии	48
Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	54
2.1 Сборы из природных популяций	54
2.2 Коллекция лабораторных линий <i>Drosophila melanogaster</i>	55
2.3 Выделение ДНК	56
2.4 Полимеразная цепная реакция	57
2.5 Постановка эксперимента по анализу динамики инфицированности ящичных популяций <i>Drosophila melanogaster</i>	59
2.6 Ход эксперимента	61
Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ	63
3.1 Инфицированность природных популяций <i>Drosophila melanogaster</i> Евразии симбиотической бактерией <i>Wolbachia</i>	63
3.2 Генотипическое разнообразие <i>Wolbachia</i> в природных популяциях <i>D. melanogaster</i> Евразии	65
3.3 Разнообразие митотипов <i>Drosophila melanogaster</i> в природных популяциях	66
3.4 Цитотипическое разнообразие лабораторных линий <i>Drosophila melanogaster</i>	73
3.5 Динамика цитотипов <i>Drosophila melanogaster</i> в экспериментальных популяциях	76
Глава IV. ОБСУЖДЕНИЕ	91
4.1 Распространенность симбиотической бактерии <i>Wolbachia</i> в природных популяциях <i>Drosophila melanogaster</i>	91
4.2 Разнообразие генотипов <i>Wolbachia</i> в природных популяциях <i>D. melanogaster</i> мира	93
4.3 Разнообразие митотипов <i>D. melanogaster</i> в природных популяциях	96
4.4 Цитотипическое разнообразие лабораторных линий <i>Drosophila melanogaster</i>	98

4.5	Динамика двух генотипов <i>Wolbachia</i> в экспериментальных популяциях <i>D. melanogaster</i>	101
	ВЫВОДЫ.....	108
	Список используемой литературы	110

Список сокращений

ЦН – цитоплазматическая несовместимость

ПЦР – полимеразная цепная реакция

мтДНК – митохондриальная ДНК

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфаты

VNTR (Variable Number Tandem Repeat) – минисателлитный локус

IS5 (Insertion Sequence) – инсерционная последовательность

wsp (Wolbachia Surface Protein) – ген кодирующий белок клеточной поверхности *Wolbachia*

16SrRNA – ген 16S рибосомальной РНК

ftsZ – бактериальный ген, кодирующий белок клеточного деления.

gatB – бактериальный ген В субъединицы аспартил-глутамил-тРНК-аминотрансферазы.

coxA – бактериальный ген второй субъединицы цитохромоксидазы.

hspA – бактериальный ген консервативного белка с неизвестной функцией.

fbpA – бактериальный ген фруктозо-бисфосфат альдолазы.

gltA – бактериальный ген цитрат-синтазы.

groEL – бактериальный ген, кодирующий белок теплового шока.

ВВЕДЕНИЕ

Взаимоотношения между различными организмами играют важную роль в живой природе. Симбиотические взаимодействия могут проявляться в самых разных аспектах, таких, как мутуализм (взаимовыгодное сосуществование двух и более организмов), комменсализм (один организм использует другой организм, но не влияет на него), аменсализм (один организм угнетает другой без извлечения для себя выгоды), нейтрализм (совместно обитающие организмы не оказывают друг на друга никакого воздействия) и паразитизм (вредное влияние одного организма на другого, с целью извлечения выгоды). Исключительную роль симбиоз играет в макро- и микроэволюции организмов. Еще в 1869 г. было обнаружено, что лишайники произошли в результате симбиоза грибов и водорослей, что доказывает важную роль симбиотических взаимоотношений в эволюции. На основании этого открытия А.С. Фаминцыным и К.С. Мережковским была выдвинута гипотеза симбиогенетического происхождения клеток зеленых растений (Фаминцын, 1907; Мережковский, 1909; Воронцов, 1999). К.С. Мережковским был предложен термин «симбиогенез», активно используемый и по сей день. Электронно-микроскопические исследования дали множество фактов, свидетельствующих в пользу теории симбиогенеза. В настоящее время общепризнано положение о том, что митохондрии, фотосинтезирующие пластиды и даже ядро эукариотических клеток происходят от бактерий, как результат симбиоза (Маргелис, 1983; Margulis, 2010). Изучение симбиотических взаимоотношений представляет огромный научный интерес для многих разделов биологии – от молекулярной биологии до эволюции.

Около половины всего видового разнообразия членистоногих в настоящее время являются хозяевами эндосимбиотической бактерии

Wolbachia (Hilgenboecker *et al.*, 2008; Zug, Hammerstein, 2012). Главной особенностью этой матерински-наследуемой бактерии является ее способность влиять на репродуктивную функцию у вида-хозяина, обеспечивая себе возможность быстрого распространения в популяции. Подобное влияние носит черты паразитизма. Однако для многих симбиотических ассоциаций *Wolbachia*–вид-хозяин описано мутуалистическое действие бактерии (Hoerauf *et al.*, 1999, 2000; De Barro, Hart, 2001; Dedeine *et al.*, 2001; Dobson *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2002; Rajan, 2004; Dong *et al.*, 2007; Hosokawa *et al.*, 2010). Молекулярные механизмы как мутуалистических, так и паразитических взаимоотношений этого симбионта со своими хозяевами остаются мало изученными.

Drosophila melanogaster – один из распространенных модельных объектов в современной биологии – является видом-хозяином *Wolbachia*. Присутствие бактерии обнаруживается в природных популяциях *Drosophila melanogaster* по всему миру, а доля инфицированных особей в отдельных популяциях может достигать 100 %, в то время как в других популяциях она не превышает и 20 % (Hoffmann *et al.*, 1994, 1998). При анализе генотипического разнообразия *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster* было обнаружено существенное преобладание одного генотипа – wMel. Было показано, что данный генотип бактерии за несколько лет вытеснил ранее распространенный генотип wMelCS (Riegler *et al.*, 2005). Причины и механизм этого процесса до сих пор остаются неизвестными.

Drosophila melanogaster широко используется для различных молекулярных, генетических и прочих биологических исследований. Хорошая генетическая изученность данного модельного объекта, а также простота его содержания, дают возможность проводить различные эксперименты в контролируемых лабораторных условиях.

Несмотря на то, что для симбиотической системы «*Wolbachia-D. melanogaster*» описано явление цитоплазматической несовместимости (ЦН), объяснить столь широкую распространенность бактерии и высокий уровень инфицированности популяций только на основании вызываемой бактерией ЦН невозможно, поскольку степень выраженности этой репродуктивной аномалии в природе крайне низкая (Hoffmann *et al.*, 1998). Поиски возможных фактов мутуалистического взаимодействия *Wolbachia* и *D. melanogaster* также не дали значимых и однозначных результатов для объяснения распространенности бактерии, поскольку обнаруженные положительные эффекты либо слабы, либо затрагивают редкие для природных популяций явления. Таким образом, причины столь высокой инфицированности природных популяций *D. melanogaster* и преобладания в них одного генотипа *Wolbachia* wMel остаются все еще нераскрытыми.

Исследование распространения *Wolbachia*, а также выявление факторов, влияющих на динамику бактерии в природных и экспериментальных (в условиях лаборатории) популяциях, позволят вскрыть и понять механизмы длительного и устойчивого существования таких симбиотических ассоциаций, как *Wolbachia-D. melanogaster* в частности, так и *Wolbachia*-членистоногие в целом.

Цели и задачи

Цель исследования – охарактеризовать распространенность и генетическое разнообразие эндосимбиотической бактерии *Wolbachia* в природных популяциях и лабораторных линиях вида-хозяина – *Drosophila melanogaster*, изучить динамику распространения и возможные механизмы поддержания двух распространенных генотипов *Wolbachia* – wMel и wMelCS, в экспериментальных популяциях, а также оценить влияние симбионта на

репродуктивную функцию хозяина – уровень эмбриональной смертности (вследствие ЦН) и плодовитости. Были поставлены следующие конкретные задачи:

1. Оценить концентрацию инфицированных бактериями *Wolbachia* особей в природных популяциях *Drosophila melanogaster* различных регионов Евразии за 2008-2013 гг.

2. Определить генотипический состав *Wolbachia* в исследуемых природных популяциях *Drosophila melanogaster*.

3. Установить концентрацию различных митохондриальных гаплотипов в природных популяциях *Drosophila melanogaster* Евразии среди свободных от *Wolbachia* особей.

4. Оценить цитотипическое разнообразие и уровень инфицированности бактерией *Wolbachia* мутантных линий *Drosophila melanogaster* фонда лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН.

5. В экспериментально созданных популяциях *Drosophila melanogaster* изучить динамику изменения концентраций двух широко распространенных генотипов *Wolbachia* – wMel и wMelCS.

6. На основании данных, полученных в эксперименте, оценить значения уровня цитоплазматической несовместимости и относительной плодовитости вида-хозяина. Определить характер влияния wMel- и wMelCS-генотипов *Wolbachia* на репродуктивную функцию *Drosophila melanogaster*.

Научная новизна работы

В ходе работы был проведен анализ инфицированности бактерией *Wolbachia* природных популяций *Drosophila melanogaster* различных регионов

за 2008-2013 гг. В ходе исследования обнаружен новый генотип *Wolbachia* – wMel4. Впервые дана оценка генотипического разнообразия симбиотической бактерии *Wolbachia* и митотипического разнообразия *D. melanogaster* в природных популяциях.

Впервые проведен подробный скрининг большой коллекции линий *D. melanogaster* фонда лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН на инфицированность бактерией *Wolbachia* и митотип.

Для наиболее часто встречающихся в природных популяциях *D. melanogaster* по всему миру генотипов *Wolbachia* – wMel и wMelCS, было проведено подробное исследование их динамики в условиях экспериментальных ящичных популяций. Исследование проводилось в популяциях, где *Wolbachia* была представлена как двумя генотипами, так и каждым генотипом по отдельности. Показано, что в экспериментальных популяциях влияние *Wolbachia* на динамику инфицированности крайне слабое, а изменение частот инфицированности происходит за счет действия случайных факторов. Впервые был проведен анализ динамики митотипов *D. melanogaster* в экспериментальных популяциях. Обнаружено, что соотношение митотипов в течение 20 поколений не изменилось.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в ходе работы данные, в совокупности с ранее известными, существенно дополняют картину распространенности бактерии *Wolbachia* на евразийском континенте. Внесен существенный вклад в общую картину генетического разнообразия внутриклеточного симбионта *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster*. Охарактеризовано цитотипическое разнообразие *D. melanogaster* среди большой коллекции линий фонда лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН. Обнаружены случаи

возможной утраты *Wolbachia* в ходе длительного культивирования линий в лаборатории. Определение митотипа совместно с генотипированием *Wolbachia* может стать надежным способом проверки происхождения линий. Обнаруженное отсутствие изменений частот генотипов *Wolbachia* в экспериментальных популяциях *D. melanogaster* может говорить о том, что причиной широкого распространения бактерии в природе являются условия среды и генетические факторы. Полученные в данной работе данные позволят лучше понять механизм взаимоотношений внутри симбиотической системы *Wolbachia-Drosophila melanogaster*.

Структура и объем работы

Диссертация содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы и список литературы. Работа изложена на 135 страницах, включает 18 рисунков и 10 таблиц. Список цитируемой литературы включает 201 наименование.

Апробация работы

Результаты работы были представлены: на 47 и 48-й Международной научной студенческой конференции “Студент и научно-технический прогресс”, секция Биология. Новосибирск, НГУ, 2009 г. и 2010 г.; на 16-й Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов - 2009”, секция “Биология”. Москва. 2009 г.; на съезде генетиков и селекционеров, посвященном 200-летию со дня рождения Ч. Дарвина и 5-м съезде ВОГиС, Москва, 2009 г.; на Crimean Meeting: Third International Conference, Dedicated N.V. Timofeeff-Ressovsky “Modern Problems of Genetics, Radiobiology, Radioecology and Evolution” & Third Readings after V.I. Korogodin

and V.A. Shevchenko; NATO Advanced Research Workshop “Radiobiological Issues Pertaining to Environmental Security and Ecoterrorism”, Alushta, 2010; на Международной конференции “Проблемы популяционной и общей генетики” и Международной молодежной конференции “Популяционная генетика: современное состояние и перспективы”, посвященных 75-летию Ю.П. Алтухова, Москва, 2011 г.; на Всероссийской конференции молодых ученых «Экология: традиции и инновации», Екатеринбург, 2012 г.; на 6-м съезде ВОГиС и ассоциированных генетических симпозиумах, Ростов-на-Дону, 2014 г.

Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Симбиотическая бактерия *Wolbachia*

Wolbachia – это род симбиотических бактерий из семейства Anaplasmataceae, отряда Rickettsiales, класса альфа-протеобактерий. Впервые *Wolbachia* была обнаружена в репродуктивных тканях комара *Culex pipiens* в 1924 г. (Hertig, Wolbach, 1924). В 1936 г. бактерия получила своё официальное название – *Wolbachia pipientis* (Hertig, 1936). Видовое многообразие внутри рода *Wolbachia* ограничено единственным видом – *Wolbachia pipientis*. Бактерия *Wolbachia* представляет собой симбиотическую бактерию и не является патогенном. *Wolbachia* широко распространена среди членистоногих (Hertig, Wolbach, 1924; Hertig, 1936; Hilgenboecker *et al.*, 2008; Zug, Hammerstein, 2012) и некоторых видов нематод (Bandi *et al.*, 1998; Fenn *et al.*, 2004, 2006; Haegeman *et al.*, 2009).

Помимо *Wolbachia*, к семейству Anaplasmataceae относятся такие рода бактерий, как *Aegyptianella*, *Anaplasma* и *Ehrlichia* (рис. 1.1). Их представители являются паразитами млекопитающих, обитающими в кровяных клетках и передающимися через насекомых. Представители близкого к семейству Anaplasmataceae семейства Rickettsiaceae также являются внутриклеточными кровяными паразитами млекопитающих и человека, передающимися через насекомых и вызывающими тяжелые инфекционные заболевания, такие, как сыпной тиф, различные лихорадки и прочие риккетсиозы.

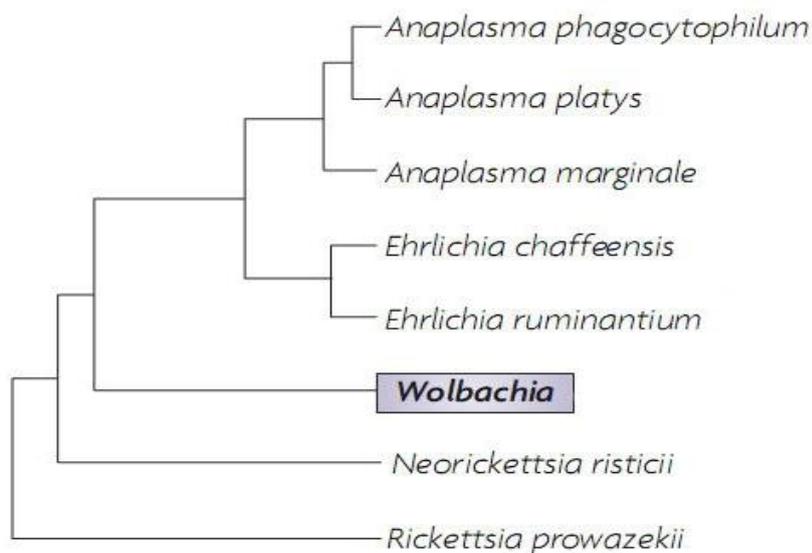


Рис. 1.1. Филогенетические взаимоотношения *Wolbachia* с другими представителями семейства *Anaplasmataceae* и близким семейством *Rickettsiaceae* (из Werren *et al.*, 2008, с изменениями).

1.2. Распространенность *Wolbachia*

Внутри класса насекомые хозяевами *Wolbachia* являются представители всех основных отрядов: жесткокрылые, двукрылые, чешуекрылые, перепончатокрылые, равнокрылые, прямокрылые и других (Werren, 1995; Bordenstein, Rosengaus, 2005; Hilgenboecker *et al.*, 2008). Уже первые анализы распространенности бактерии среди насекомых, основанные на ПЦР-анализе по бактериальному гену *ftsZ*, выявили, что около 17 % их видового разнообразия может быть инфицировано *Wolbachia* (Werren *et al.*, 1995). Под инфицированностью *Wolbachia* в данной работе подразумевается наличие бактерии у вида-хозяина. Позднее, с использованием более чувствительного метода Long-PCR для гена *wsp* *Wolbachia*, было показано, что 3/4 видов насекомых являются носителями этой симбиотической бактерии (Jeunprakash, Ноу, 2000). По мере накопления данных, по результатам анализа 917 видов членистоногих, было получено значение инфицированности бактерией

Wolbachia на уровне 66 % видов (Hilgenboecker *et al.*, 2008). При уточнении данных этой работы, доля инфицированных *Wolbachia* видов членистоногих, существующих в настоящее время, уменьшилась до уровня 40 % (Zug, Hammerstein, 2012).

1.3. Локализация *Wolbachia* в организме хозяина

Передача бактерии осуществляется строго вертикально по материнской линии через цитоплазму яйцеклетки, поэтому обнаруживается *Wolbachia* преимущественно в репродуктивных тканях хозяина (Дудкина и др., 2004; Захаров, Марков, 2005). Помимо этого, *Wolbachia* может быть обнаружена в клетках различных соматических тканей: в кишечнике и мальпигиевых сосудах, в жировых тельцах и гемоцитах, в слюнных железах и мышечных тканях, в сетчатке и клетках мозга. (Clark *et al.*, 2005; Saridaki, Bourtzis, 2010; Faria, Sucena, 2013, Strunov *et al.*, 2013). Был обнаружен штамм *Wolbachia* - wMelPop, активно пролиферирующий во взрослых особях *Drosophila melanogaster*, преимущественно в клетках головного мозга, а также в клетках сетчатки и в мышцах. В результате происходит деградация тканей, в том числе, и нервной системы, что приводит к ранней гибели взрослых мух (Min, Benzer, 1997; Strunov *et al.*, 2013).

1.4. Репродуктивные аномалии, индуцируемые *Wolbachia*

Основными особенностями симбиотической бактерии *Wolbachia* являются, во-первых, строго вертикальная передача от материнской особи к потомству, а во-вторых, способность влиять на репродуктивную функцию вида-хозяина путем индукции различных аномалий: феминизации, андроцида

(гибель самцов-потомков), партеногенеза и цитоплазматической несовместимости (ЦН).

1.4.1. Феминизация

Индукцированная *Wolbachia* феминизация заключается в переопределении пола генетического самца, инфицированного бактерией, в фенотипическую самку. Это явление описано, в основном, для равноногих ракообразных, но также встречается у представителей отрядов чешуекрылые и полужесткокрылые (Bouchon *et al.*, 1998; Kageyama *et al.*, 2002; Negri *et al.*, 2006). Возможным механизмом феминизации может быть описанное у *Armadillium vulgare* блокирование развития андрогенной железы, что препятствует развитию мужской особи (Rigaud *et al.*, 1991, 1999; Azzouna *et al.*, 2004).

1.4.2. Андроцид

В потомстве инфицированной самки на ранних стадиях онтогенеза *Wolbachia* может вызывать гибель эмбрионов, из которых должны развиваться самцы. Впервые отсутствие самцов в популяциях было описано для представителя отряда жесткокрылые – божьей коровки *Adalia bipunctata* (Лус, 1947). В дальнейшем была подтверждена бактериальная природа этого явления (Hurst *et al.*, 1992). У *A. bipunctata* выявили три различные бактерии, одной из которых была *Wolbachia* (Захаров и др., 1998, 2000; Werren *et al.*, 1994). Индуцированный *Wolbachia* андроцид описан также для отрядов чешуекрылые (Jiggins *et al.*, 1998) и двукрылые (Hurst *et al.*, 2000).

1.4.3. Партеногенез

Одним из методов воздействия *Wolbachia* на репродуктивную функцию хозяина является индукция партеногенеза. Данное явление заключается в том, что отложенные самками яйца развиваются без оплодотворения, в результате чего потомство имеет материнский генотип. Выделяют телитокный партеногенез, при котором формируются только сыновья, и аррентокный, при котором получаются только дочери. Важные исследования явления партеногенеза проведены для тутового шелкопряда. Был разработан эффективный метод температурной активации партеногенетического развития для этого вида. При воздействии высокой температуры на кладку, в яйцах происходит подавление редукционного деления, а эквационное деление приводит к образованию диплоидного пронуклеуса материнского генотипа (Астауров, 1940, 1977). Индуцированный *Wolbachia* партеногенез также связан с диплоидизацией неоплодотворенных яиц, которая происходит во время первого митотического деления и приводит к развитию самок. Таким образом, число инфицированных самок в популяции увеличивается (Zchori-Fein, Bourtzis, 2012). Телитокный партеногенез описан для некоторых клещей, коллембол и некоторых представителей перепончатокрылых (Stouthamer, Werren, 1993; Werren *et al.*, 1995; Zchori-Fein *et al.*, 1995, 1998; Arakaki *et al.*, 2001).

1.4.4. Цитоплазматическая несовместимость

Цитоплазматическая несовместимость является наиболее распространенным репродуктивным нарушением, обусловленным *Wolbachia* (Hsiao, Hsiao, 1985; Breeuwer *et al.*, 1990, 1992, 1993, 1997; Hurst, 1991; Perrot-Minnot *et al.*, 1996; James, Ballard, 2000; Jamnongluk *et al.*, 2000). Впервые роль *Wolbachia* в индукции ЦН была описана в 1970-х годах для комаров *Culex*

piriens (Yen, Barr, 1971, 1973). К настоящему времени это явление обнаружено у представителей таких отрядов, как жесткокрылые, перепончатокрылые, равнокрылые и двукрылые (O'Neill *et al.*, 1992; Bressac, Rousset, 1993; Werren, 1997a).

Выделяют два типа ЦН: однонаправленную, при которой инфицированный самец скрещивается с неинфицированной самкой, и двунаправленную – скрещивание особей, несущих разные штаммы бактерии, несовместимые между собой (рис. 1.2).

Наибольшее число исследований, посвященных ЦН, проведено на комарах рода *Culex* и мухах рода *Drosophila* (Hoffmann *et al.*, 1986, 1988, 1990, 1994, 1996; Guillemand *et al.*, 1997; Ahantarig *et al.*, 2008).



Рис. 1.2. Варианты скрещивания особей разного инфекционного статуса. W^+ - инфицированная особь, W^- - неинфицированная особь; $W1$, $W2$ – разные штаммы *Wolbachia*.

1.4.4.1. Факторы, влияющие на степень проявления ЦН

Уровень ЦН, индуцируемой *Wolbachia*, не является постоянным, и у разных видов может зависеть от ряда факторов: штамм *Wolbachia*, вид-хозяина бактерии и возраста самцов.

Влияние штамма *Wolbachia* на выраженность ЦН ярко выражено у *Drosophila simulans*, у которого известно пять штаммов бактерии, отличающихся между собой по силе вызываемой ЦН: один индуцирует сильную несовместимость, два – характеризуются низким уровнем ЦН и еще для двух штаммов индукция ЦН не описана (Hoffmann *et al.*, 1990; Turelli, Hoffmann, 1991; Turelli *et al.*, 1992).

На выраженность несовместимости может влиять и генетический фон вида-хозяина, что, например, описано в эксперименте по переносу *Wolbachia* между двумя представителями рода *Drosophila* – *D. melanogaster* и *D. simulans* (Boyle *et al.*, 1993; Poinot *et al.*, 1998). Одним из штаммов *Wolbachia*, известным для *D. simulans*, является wRi, который вызывает сильную ЦН (Hoffmann *et al.*, 1990; Turelli, Hoffmann, 1991; Turelli *et al.*, 1992). Штамм wMel у *D. melanogaster* индуцирует слабо выраженную ЦН (Hoffmann *et al.*, 1994; Solignac *et al.*, 1994; Илинский, 2008; Илинский, Захаров, 2009). Путем микроинъекции инфицированная цитоплазма из эмбрионов *D. simulans* вводилась в неинфицированные эмбрионы *D. melanogaster*. Полученные инфицированные линии *D. melanogaster* показывали низкий уровень ЦН. В то же время, при переносе *Wolbachia* от *D. melanogaster* к *D. simulans*, инфицированные линии демонстрировали 100 % эмбриональную гибель (Poinot *et al.*, 1998; Mercot, Charlat, 2004).

В некоторых случаях на степень выраженности ЦН может влиять возраст самцов-отцов. Так для видов рода *Drosophila* показано, что чем старше инфицированный самец, тем менее выражена ЦН при его скрещивании с неинфицированной самкой (Hoffmann *et al.*, 1990). Подобное влияние описано также для комаров *Aedes albopictus* и для некоторых других видов (Clark *et al.*, 2002). Также уровень ЦН может зависеть от времени развития самцов: особи, развивающиеся быстрее, дают более высокий уровень ЦН в скрещиваниях (Yamada *et al.*, 2007).

1.4.4.2. Механизмы ЦН

В настоящее время нет точного описания механизма, посредством которого *Wolbachia* индуцирует ЦН. Предполагается, что в этом процессе задействованы два фактора *Wolbachia*, противоположные по эффекту: фактор модификации («mod» – modification) и фактор спасения («resc» – rescue) (Werren, 1997a; Poinsot *et al.*, 2003; Mercot, Poinsot, 2009). На этом предположении основывается модель модификации/спасения, которая подразумевает существование фактора «mod» у самцов и фактора «resc» у самок. У самцов происходит модификация генетического материала, которая приводит к эмбриональной гибели потомства в несовместимом скрещивании. В случае скрещивания с инфицированной самкой, resc-фактор снимает модификацию, и потомство развивается нормально. Были предложены три возможных схемы взаимодействия данных факторов между собой: «ключ-замок», «титрование-восстановление» и «медленное движение» (Kose, Kart, 1995; Werren, 1997a; Callaini *et al.*, 1997; Charlat *et al.*, 2001; Poinsot *et al.*, 2003).

Согласно схеме «ключ-замок» (рис. 1.3 А), производимый бактерией mod-фактор у самца, связывается с хромосомами и, таким образом, модифицирует отцовский генетический материал (рис. 1.3 А (1), (2)). При слиянии такого генетического материала с неинфицированной яйцеклеткой наблюдается несовместимость (рис. 1.3 А (3), (4)). В инфицированных яйцеклетках *Wolbachia* продуцирует resc-фактор, который, взаимодействуя с mod-фактором сперматозоида по принципу «ключ-замок», снимает модификацию (рис. 1.3 А (5), (6)).

В случае гипотезы «титрования-восстановления» предполагается, что фактор mod у самцов воздействует на компоненты системы конденсации хроматина, и, таким образом, препятствует конденсации генетического

материала самца (рис. 1.3 В (1), (2)). При оплодотворении таким сперматозоидом неинфицированной яйцеклеткой возникает ЦН (Рис. 1.3 В (3), (4)). Если самка инфицирована, то фактор *resc*, продуцируемый *Wolbachia* в яйцеклетках хозяина, нивелирует действие *mod*-фактора и конденсация отцовского хроматина протекает без нарушений (Рис. 1.3 В (5), (6)).

Модель «медленного движения» подразумевает, что *mod*-фактор, связываясь с отцовскими хромосомами, задерживает их вступление в первое митотическое деление оплодотворенного яйца (Рис. 1.3 С (1), (2)). Таким образом, эмбриональная гибель при несовместимом скрещивании происходит вследствие асинхронности первого деления (Рис. 1.3 С (3), (4)). Если оба родителя инфицированы, то их генетический материал одинаково модифицирован фактором *Wolbachia* и синхронность первого митотического деления не нарушается (Рис. 1.3 С (5), (6)).

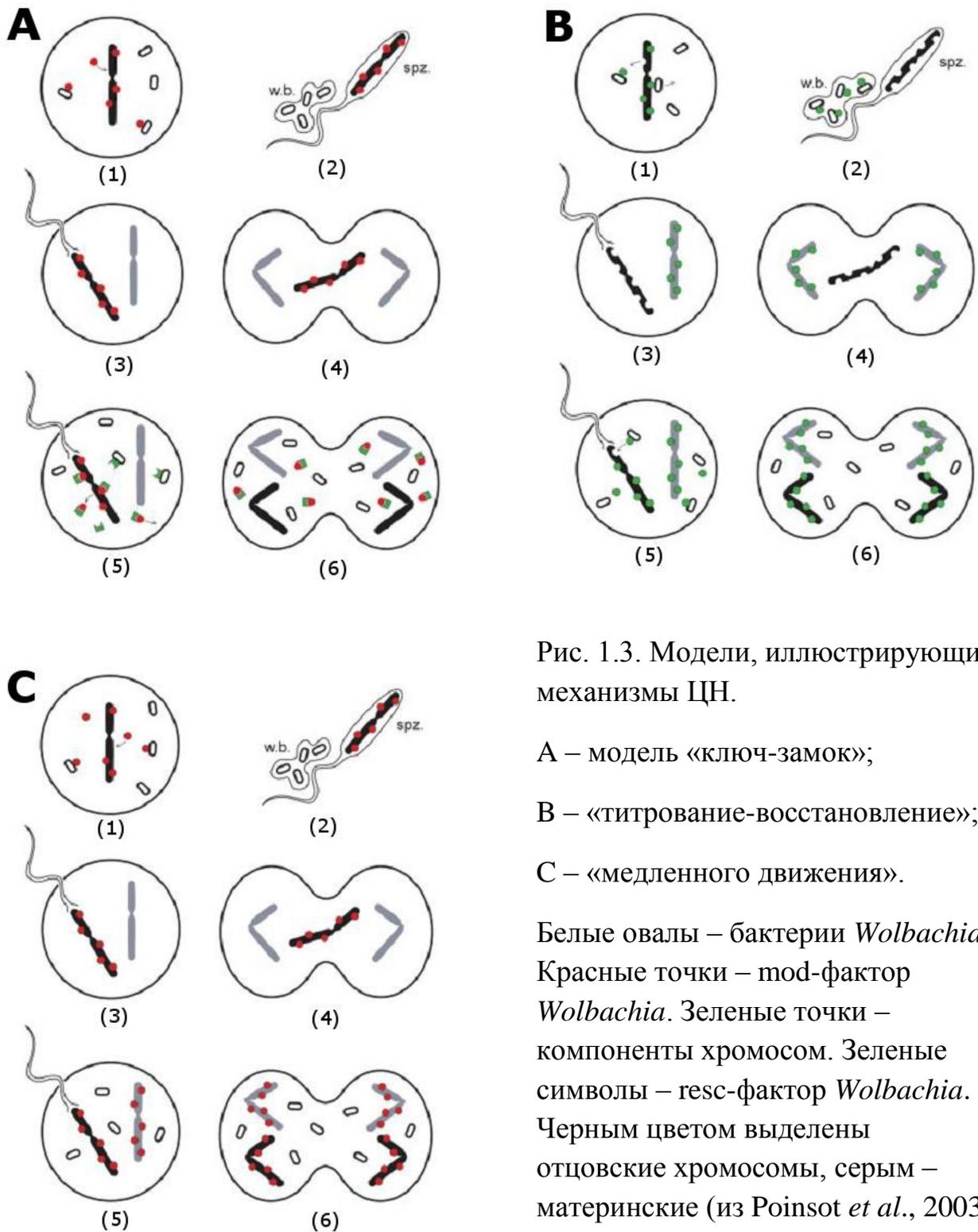


Рис. 1.3. Модели, иллюстрирующие механизмы ЦН.

А – модель «ключ-замок»;

В – «титрование-восстановление»;

С – «медленного движения».

Белые овалы – бактерии *Wolbachia*. Красные точки – mod-фактор *Wolbachia*. Зеленые точки – компоненты хромосом. Зеленые символы – resc-фактор *Wolbachia*. Черным цветом выделены отцовские хромосомы, серым – материнские (из Poinsot *et al.*, 2003, с изменениями).

В рамках гипотезы модификации/спасения выделяют четыре класса *Wolbachia* по их способности модифицировать/спасать генетический материал: 1) mod+/resc+ – *Wolbachia* способна как модифицировать, так и снимать модификацию генетического материала (инвазивный класс); 2) mod-/resc- – бактерия не индуцирует ЦН и не снимает модификацию (беспомощный или безразличный); 3) mod-/resc+ – *Wolbachia* не модифицирует генетический материал, но может снимать модификацию (защитный); 4) mod+/resc- – так называемый «суицидальный» класс, не обнаруженный в природе и способный только модифицировать, но не спасать (Zabalou *et al.*, 2008). Было показано, что каждый класс *Wolbachia* может полностью или частично нейтрализовать влияние *Wolbachia* другого класса (Zabalou *et al.*, 2008; Mercot, Poinso, 2009).

Таблица 1.1. Взаимоотношения между четырьмя разными классами *Wolbachia* на основании их способности к модификации/спасению. Показаны результаты разных типов скрещивания. W⁻ – неинфицированные особи; × – несовместимое скрещивание (из Mercot, Poinso, 2009, с модификациями).

♀ ♂	♀	W ⁻	mod+/resc+	mod-/resc+	mod+/resc-	mod-/resc-
♂	W ⁻	W ⁻	mod+/resc+	mod-/resc+	mod+/resc-	mod-/resc-
mod+/resc+	×	mod+/resc+	mod-/resc+	×	×	×
mod-/resc+	W ⁻	mod+/resc+	mod-/resc+	mod+/resc-	mod-/resc-	mod-/resc-
mod+/resc-	×	mod+/resc+	mod-/resc+	×	×	×
mod-/resc-	W ⁻	mod+/resc+	mod-/resc+	mod+/resc-	mod-/resc-	mod-/resc-

Последующие исследования выявили, что при ЦН происходят нарушения множества событий профазы и метафазы в пронуклеусе самца, в частности,

активации циклин-зависимой киназы 1 (Cdk1), конденсации и сегрегации хромосом (Landmann *et al.*, 2009). Активация циклин-зависимой киназы 1 необходима для запуска хромосомной конденсации, следовательно, нарушения в работе этого белка приводят к нарушению конденсации хромосом (Royou *et al.*, 2008). Было отмечено, что в несовместимых скрещиваниях происходит задержка осаждения гистонов H3.3 и H4 во время интерфазы. В результате происходит задержка активации циклин-зависимой киназы 1 в пронуклеусе самца и начала фазы митоза (рис. 1.4) (Landmann *et al.*, 2009).

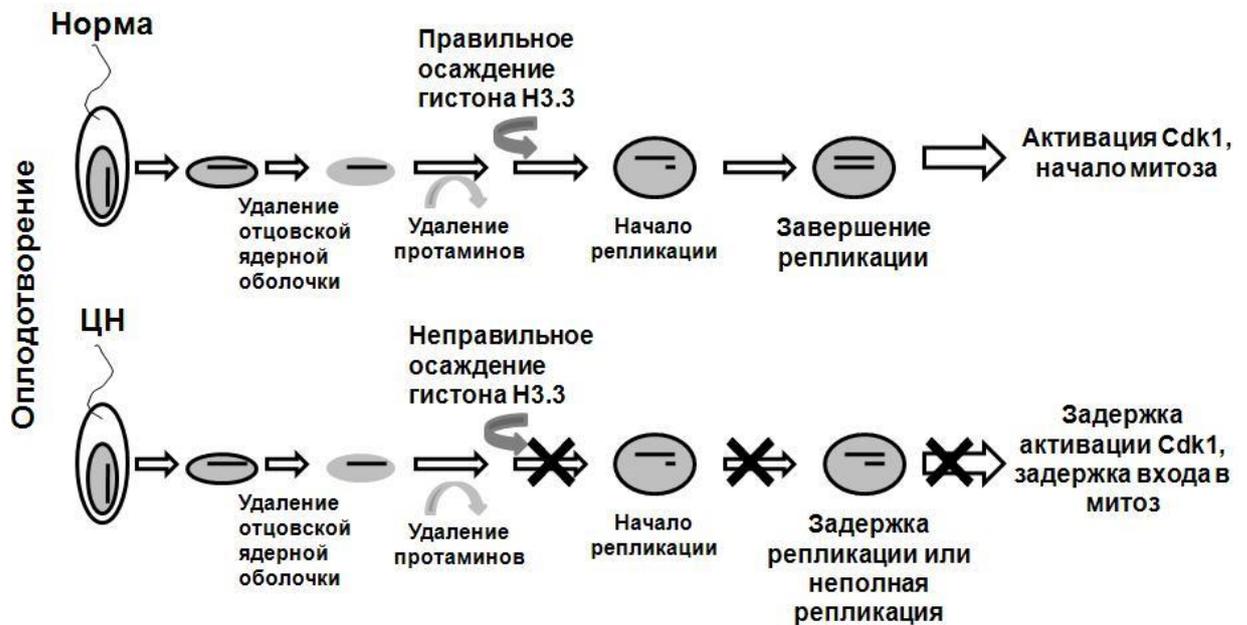


Рис. 1.4. Схема ключевых событий при формировании пронуклеуса самца в нормальном и несовместимом скрещиваниях (из Landmann *et al.*, 2009, с изменениями).

Исследования последнего десятилетия механизмов возникновения ЦН показали возможность участия в нем шаперона HIRA, связанного с гистоном H3.3. Шаперон HIRA играет важную роль в осаждении гистонового комплекса H3.3/H4 в пронуклеусе самца и задействован в сборке отцовского хроматина

во время формирования пронуклеуса (Lorpin *et al.*, 2005; Bonnefoy *et al.*, 2007). Была установлена связь между уровнем экспрессии *Hira* и силой проявляемой ЦН: чем ниже уровень экспрессии, тем выше уровень несовместимости, индуцированной *Wolbachia*. Показано, что мутации по гену *Hira* у неинфицированных самцов могут привести к аналогичному вызываемой *Wolbachia* ЦН эффекту (Zheng *et al.*, 2011).

1.5. Классификация *Wolbachia*

Род *Wolbachia* включает в себя единственный вид – *Wolbachia pipientis*, для которого, на основании генетического разнообразия, выделяется большое количество штаммов. Все описанные к настоящему моменту штаммы *Wolbachia* распределяются по супергруппам, число которых, по различным источникам, составляет от 10 до 13 (Baldo, Werren, 2007; Werren *et al.*, 2008; Naegeman *et al.*, 2009; Ros *et al.*, 2009; Augustinos *et al.*, 2011). Каждая супергруппа обозначается латинской буквой от А до N. В филогенетических построениях для *Wolbachia* используются различные бактериальные гены (*16SrRNA*, *wsp*, *gltA*, *groEL*, *hcpA*, *coxA*, *ftsZ*, *gatB*, *fbpA* и другие), поскольку разрешающая способность каждого гена ограничена. В наиболее устоявшейся классификации *Wolbachia* выделяют 7 супергрупп: А, В, С, D, Е, F и Н (рис 1.5).

Штаммы *Wolbachia* супергрупп А и В являются наиболее распространенными среди членистоногих, особенно среди насекомых (Breeuwer *et al.*, 1992; Werren *et al.*, 1995a, b), и только для них обнаружена способность к индукции репродуктивных аномалий у видов-хозяев (Werren, 1997a; Serbus *et al.*, 2008). Бактерию *Wolbachia* нематод относят к супергруппам С и D (Bandi *et al.*, 1998). Супергруппа Е описана только у коллембол (Vandekerckhove *et al.*, 1999; Timmermans *et al.*, 2004). *Wolbachia*

супергруппы F обнаруживаются среди нематод, а также среди некоторых членистоногих (Lo *et al.*, 2002; Casiraghi *et al.*, 2005; Sakamoto *et al.*, 2006; Covacin, Barker, 2007; Baldo *et al.*, 2007; Panaram, Marshall, 2007). *Wolbachia* супергруппы H была описана только у термитов (Bordenstein, Rosengaus, 2005). Супергруппа G была выделена у пауков рода *Diaea* на основании анализа генов *Wolbachia 16SrRNA* и *wsp* (Rowley *et al.*, 2004). По результатам анализа по генам *gltA*, *ftsZ* и *groEL* пришли к заключению, что данный штамм *Wolbachia* является рекомбинантным между штаммами супергрупп A и B, и не может быть выделен в самостоятельную супергруппу (Baldo, Werren, 2007).

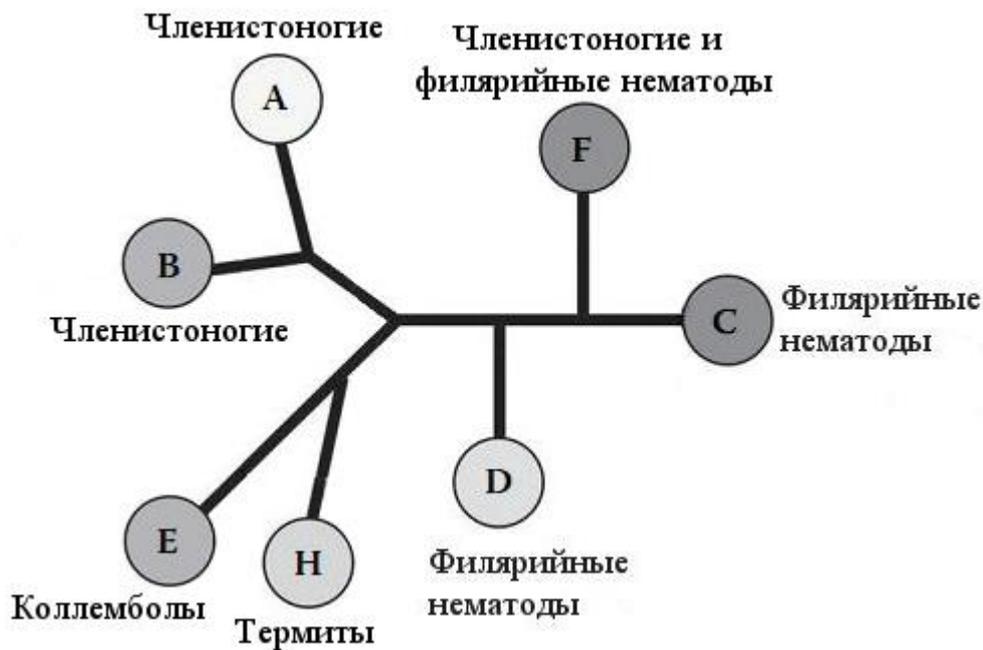


Рис. 1.5. Схематическое отображение общепринятой классификации *Wolbachia* по супергруппам (из Zchori-Fein, Bourtzis, 2012, с изменениями). Длина ветвей не отражает филогенетические расстояния.

В дальнейшем, на основании анализа генов *gltA*, *ftsZ* и *groEL* были выделены три новые супергруппы: *Wolbachia* супергруппы I была обнаружена у двух видов блох, J – у представителей паразитических нематод рода

Dipetalonema, а К – у представителей одного вида паутиных клещей (Ros *et al.*, 2009).

На основании анализа генов *16SrRNA*, *ftsZ* и *groEL* у растительной нематоды *Radopholus similis* была выделена *Wolbachia*, которую определили в новую супергруппу L. У тлей выделяют две супергруппы *Wolbachia* – М и N, но только на основе изменчивости по одному гену - *16SrRNA* (Augustinos *et al.*, 2011).

1.6. *Wolbachia* в популяциях видов-хозяев

Из классификации *Wolbachia* по супергруппам видно, что бактерия формирует большое количество симбиотических ассоциаций с представителями различных видов членистоногих и нематод. Для многих видов, популяции которых инфицированы *Wolbachia*, отмечается высокая частота инфицированных особей (Werren 1997a, b). На уровень инфицированности может влиять степень выраженности репродуктивных аномалий. Так, в популяциях с высоким уровнем ЦН доля инфицированных особей обычно высока, а для популяций с низким уровнем ЦН – может варьировать от низких значений до высоких (Turelli, 1994; Werren, 1997a; Schoenmaker *et al.*, 1998). В целом, было установлено, что частота инфицированности бактерией *Wolbachia* среди различных видов может принимать либо очень низкие (меньше 10 %) значения, либо очень высокие – больше 90 % (Hilgenboecker *et al.*, 2008).

Вызываемые *Wolbachia* репродуктивные аномалии, такие как партеногенез, андроцид и феминизация, могут влиять на половую структуру популяций, смещая соотношение полов в сторону увеличения доли самок (Лус, 1947; Jiggins *et al.*, 1998; Hurst *et al.*, 2000; Kageyama *et al.*, 2002; Negri *et al.*, 2006). Учитывая тот факт, что *Wolbachia* передается по материнской

линии, в таких популяциях уровень инфицированности также должен быть высоким.

Поскольку наиболее популярным и удобным модельным объектом генетических исследований являются мухи рода *Drosophila*, именно для них проведено наибольшее количество исследований по изучению влияния *Wolbachia* на вид-хозяин. Наиболее популярными объектами исследований, благодаря своей широкой распространенности и простоте содержания, являются *Drosophila simulans* и *Drosophila melanogaster*.

1.7. *Wolbachia* у дрозофилид

В настоящее время для рода *Drosophila* описано 1178 видов, для 50 из которых показана инфицированность эндосимбиотической бактерией *Wolbachia* (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>, <http://www.taxodros.uzh.ch/>). Среди дрозофилид *Wolbachia* вызывает такие репродуктивные аномалии, как андроцид и цитоплазматическая несовместимость. Явление андроцида описано для двух видов *Drosophila*: *D. bifasciata* и *D. innubila* (Veneti *et al.*, 2004; Dyer *et al.*, 2005). ЦН встречается у таких видов, как *D. paulistorum*, *D. simulans* и *D. melanogaster*, причем у *D. paulistorum* она проявляется в виде двунаправленной несовместимости (Miller *et al.*, 2010).

1.7.1. Штаммы *Wolbachia* у *Drosophila simulans*

Для *Drosophila simulans* описано 5 штаммов *Wolbachia*: wAu, wHa, wMa, wNo и wRi. Эти штаммы отличаются друг от друга по степени проявления репродуктивных аномалий и по распространенности в природных популяциях *D. simulans*. Также эти штаммы различаются по своему положению в

супергруппах *Wolbachia*: wAu, wHa и wRi относятся к супергруппе А, а wMa и wNo – к супергруппе В.

Наиболее распространенным в мире штаммом *Wolbachia* у *D. simulans* является wRi, впервые обнаруженный в популяциях Калифорнии (Hoffmann *et al.*, 1986). Он распространен в большинстве континентальных природных популяций Африки, Австралии, Америки и Европы. Этот штамм вызывает наиболее сильную ЦН и проявляет сильную способность к инвазии (Hoffmann *et al.*, 1990; Turelli, Hoffmann, 1991; Turelli *et al.*, 1992).

Штамм wHa был впервые описан в популяциях *D. simulans* Гавайских островов (O'Neill, Karr, 1990). Этот же штамм обнаруживается в популяциях островов Французской Полинезии, Сейшельского архипелага и Новой Каледонии (Montchamp-Moreau *et al.*, 1991; Mercot *et al.*, 1995; Rousset, Solignac, 1995). Он также способен вызывать ЦН у вида-хозяина, однако ее уровень гораздо ниже, чем ЦН, вызываемая штаммом wRi.

Штамм wAu впервые был описан для популяций Австралии, но также встречается в популяциях Мадагаскара, Западной Африки и Эквадора (Mercot *et al.*, 1995; Rousset, Solignac, 1995). Для этого штамма не было обнаружено способности к индукции ЦН у вида-хозяина.

Штамм wMa был описан для популяций Мадагаскара и других популяций Восточной Африки (Nigro, 1991; Rousset, Solignac, 1995). Для него, как и для wAu, не обнаружено способности к индукции ЦН.

Штамм wNo распространен на островах Сейшельского архипелага и Новой Каледонии (Mercot *et al.*, 1995; Rousset, Solignac, 1995), и является ЦН-индуцирующим. Однако случаи инфицированности мух только этим штаммом в природных популяциях довольно редки (James *et al.*, 2002). Обычно он присутствует совместно со штаммом wHa (Mercot, Charlat, 2004).

1.7.2. Цитотипы *Drosophila simulans*

Эндосимбиотическая бактерия *Wolbachia*, подобно митохондриям, наследуется по материнскому типу: передается из поколения в поколение вида-хозяина строго вертикально – от самки к потомству. Таким образом, может прослеживаться определенная взаимосвязь между *Wolbachia* и гаплотипами митохондриальной ДНК (митотипами) вида-хозяина. Для некоторых видов членистоногих, таких, как *Armadillium vulgare* и *Porcellionides pruinosus* (Isopoda), *Solenopsis invicta* и *Biorhiza pallid* (Hymenoptera), *Culex pipiens*, *Aedes albopictus*, *Drosophila simulans* и *D. recens* (Diptera), показана сопряженная геномная изменчивость мтДНК и *Wolbachia* (Kambhampati *et al.*, 1992; Ballard, Kreitman, 1994; Guillemand *et al.*, 1997; Marcad *et al.*, 1999; Raimond *et al.*, 1999; Rigaud *et al.*, 1999; Shoemaker *et al.*, 1999, 2003, 2004; Rokas *et al.*, 2001).

Под цитотипом следует понимать совместно наследуемую ассоциацию митотипа и штамма *Wolbachia*. Для *Drosophila simulans* описаны три митотипа – siI, siII и siIII (Solignac, Monnerot, 1986). *Wolbachia* у этого вида подразделяется на 5 штаммов – wAu, wHa, wRi, wMa и wNo (Hoffmann *et al.*, 1986; O'Neill, Karr, 1990; Nigro, 1991; Mercot *et al.*, 1995; Rousset, Solignac, 1995; а также обобщающая статья Mercot, Charlat, 2004). Были обнаружены закономерности в сонаследовании разных штаммов *Wolbachia* с митотипами *D. simulans*. Так, для митотипа siI было показано сонаследование с двумя штаммами *Wolbachia* – wHa и wNo. Цитотип wHa-siI обнаруживается в популяциях *D. simulans* индо-тихоокеанских островов (Montchamp-Moreau *et al.*, 1991; Mercot *et al.*, 1995; Rousset, Solignac, 1995), в то время как цитотип wNo-siI не встречается самостоятельно в природе, поскольку штамм wNo встречается в популяциях только совместно со штаммом wHa и формирует

цитотип wHa-wNo-siI. Данный цитотип распространен только в популяциях островов Новой Каледонии и Сейшельского архипелага (Mercot *et al.*, 1995; Rousset, Solignac, 1995).

С митотипом siII сопряжен штамм *Wolbachia* wRi (Dean *et al.*, 2003), образуя цитотип wRi-siII, распространенный среди большинства континентальных популяций *D. simulans*. Также с митотипом siII совместно наследуется штамм wAu, однако цитотип wAu-siII встречается в популяциях гораздо реже (Turelli, Hoffmann, 1995; Hoffmann *et al.*, 1996; James, Ballard, 2000; Charlat *et al.*, 2003).

С митотипом siIII у *D. simulans* сопряжен только один штамм *Wolbachia* – wMa. Образуемый цитотип wMa-siIII также не является широко распространенным и встречается в некоторых популяциях Восточной Африки (Nigro, 1991; Rousset, Solignac, 1995; James, Ballard, 2000; Charlat *et al.*, 2003).

1.7.3. Штаммы *Wolbachia* у *Drosophila melanogaster*

У близкого к *D. simulans* вида – *D. melanogaster*, описан единственный штамм *Wolbachia* – wMel. На основании данных по полиморфизму ДНК бактерии было установлено, что происхождение *Wolbachia* для этого вида монофилетично (Bourtzis *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1998; McGraw *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2002; Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2005). Этот штамм относится к супергруппе А и является широко распространенным в природных популяциях *D. melanogaster*.

Размер генома *Wolbachia* штамма wMel составляет около 1,3 Мб и включает в себя около 1300 генов (GenBank NC_002978). Для наиболее переменного гена *wsp*, широко используемого в филогенетическом анализе *Wolbachia*, были выделены единичные дивергировавшие клоны, на основании

которых нельзя точно определить реальное время дивергенции бактерии, поскольку они отличаются только одной-двумя заменами (Braig *et al.*, 1998; Pidiyar *et al.*, 2003).

На основании анализа полиморфизма по пяти маркерам генома, в рамках штамма *wMel* выделяют 5 генотипов (Riegler *et al.*, 2005; Ilinsky, 2013): *wMel*, *wMelCS*, *wMelCS2*, *wMel2*, *wMel3* (Рис. 1.6). В ходе выполнения данной работы выделен еще один новый, 6-й генотип, обозначенный нами *wMel4*.

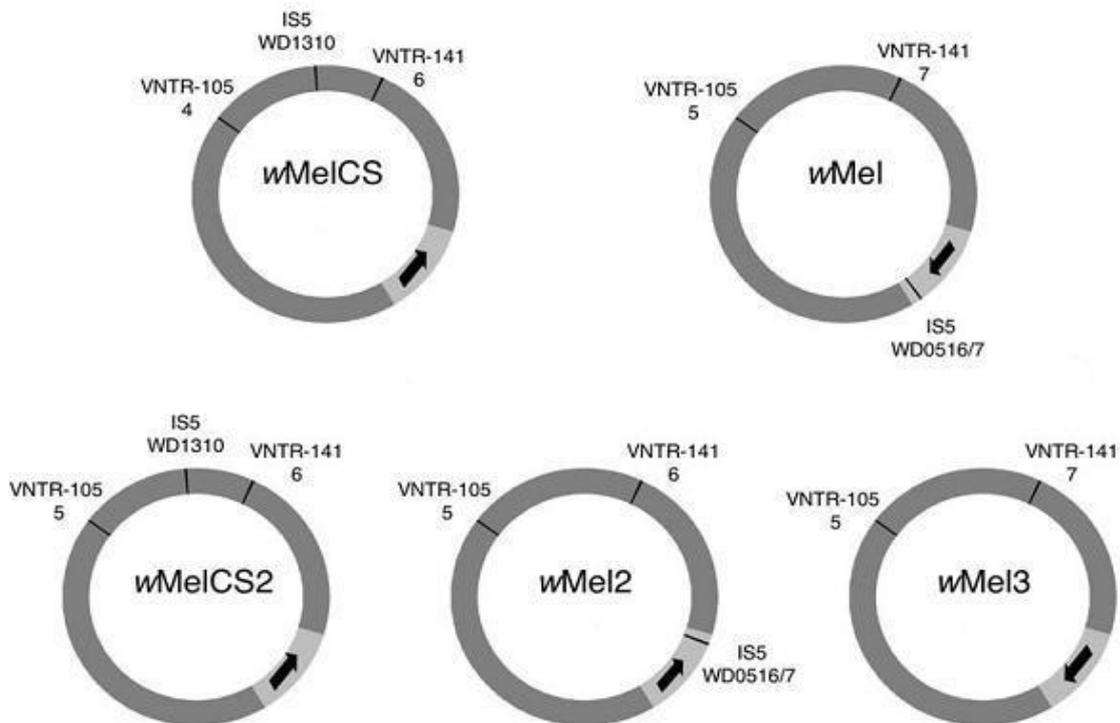


Рис. 1.6. Генотипы *Wolbachia* штамма *wMel*. Серый прямоугольник со стрелкой – инверсия; VNTR-105, VNTR-141 – тандемные повторы (число повторов обозначено цифрами под ними); IS5 WD1310 (IS5 WD0516/7) – локус встройки инсерционной последовательности (Riegler *et al.*, 2005).

Как видно из рис. 1.6, данные генотипы отличаются: (1) по количеству tandemных повторов *VNTR-105* и *VNTR-141*, (2) по наличию или отсутствию вставки инсерционной последовательности *IS5* в локусах *WD1310* и *WD516/7*, (3) по наличию/отсутствию протяженной инверсии (Riegler *et al.*, 2005; Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский, 2008).

Наиболее широко в мире распространены wMel- и wMelCS-генотипы *Wolbachia*: они присутствуют в популяциях *D. melanogaster* Северной Америки, Африки, Австралии и Евразии. Остальные генотипы относятся к числу редких (Riegler *et al.*, 2005, Nunes *et al.*, 2008). Так, генотип wMel2 встречается в популяциях *D. melanogaster* Японии, Таиланда, Китая, Филиппин и Индии, wMelCS2 встречается в популяциях Восточной Европы и Средней Азии, а генотип wMel3 был обнаружен в единичном случае в лабораторной линии. *Wolbachia* генотипа wMel4 была обнаружена в популяции п-ова Синай (Pinsky, 2013). Эти шесть генотипов подразделяются на две группы: группа MEL (генотипы wMel, wMel2, wMel3 и wMel4) и группа CS (wMelCS и wMelCS2) (Pinsky, 2013). Внутри каждой группы генотипы отличаются между собой незначительно, в то время, как отличия между генотипами разных групп достаточно велики.

1.7.4. Цитотипы *Drosophila melanogaster*

У *Drosophila melanogaster* выделяют один штамм *Wolbachia* – wMel, который подразделяется на 6 различающихся между собой генотипов (см. раздел 1.7.3). При анализе участка мтДНК, протяженностью 499 п.н., гена первой субъединицы цитохромоксидазы С из района 2151-2649 (относительно аннотированной последовательности полного генома мтДНК линии Oregon-R – AN: AF200828), были выявлены три митотипа, различающиеся полиморфизмом в позициях 2160(С/Т) и 2187(С/Т) – «СТ», «ТС» и «СС»

(Pinsky, Zakharov, 2006; Илинский, Захаров, 2007а, б). Было установлено, что *Wolbachia* генотипа wMel присутствует у особей с митотипом «СТ», особи с митотипом «ТС» инфицированы бактерией генотипа wMelCS, а митотип «СС» ассоциирован с *Wolbachia* генотипа wMelCS2.

В дальнейшем, при подробном филогенетическом анализе последовательностей мтДНК *D. melanogaster*, протяженностью 2757 п.н. и 1280 п.н., было выделено две клады мтДНК, каждой из которых соответствовала своя группа генотипов *Wolbachia* (Pinsky, 2013). К S-кладе относятся генотипы *Wolbachia* CS-группы: wMelCS и wMelCS2; к M-кладе – генотипы MEL-группы: wMel, wMel2, wMel3 и wMel4. На основании этих данных для *D. melanogaster* выделяют следующие цитотипы: M-MEL и S-CS для инфицированных *Wolbachia* особей, M-w⁻ и S-w⁻ – для неинфицированных особей. Частоты встречаемости данных цитотипов в природных популяциях *D. melanogaster* сильно различаются. На цитотипы M-MEL и M-w⁻ приходится более 90 % разнообразия, в то время как цитотипы S-CS и S-w⁻ встречаются с частотой меньше 10 % (Pinsky, 2013).

1.8. Инфицированность природных популяций *D. melanogaster* и *D. simulans* симбиотической бактерией *Wolbachia*

В пионерской работе (Solignac *et al.*, 1994), на основании анализа 266 линий *D. melanogaster* было установлено, что *Wolbachia* присутствует практически во всех регионах Мира с частотой 10-40 %. Исследование распространенности *Wolbachia* в популяциях *D. melanogaster* пяти регионов мира выявило присутствие бактерии во всех популяциях с частотой от 1 до 80 % (Vesprool, Haddrill, 2011). Наиболее активные исследования частот инфицированности *Wolbachia* природных популяций *Drosophila* проводились

для *D. melanogaster* восточного побережья Австралии (Hoffmann *et al.*, 1994, 1998), и для *D. simulans* Калифорнии (Turelly, Hoffmann, 1991, 1995).

Для калифорнийских популяций *D. simulans* было показано, что за два года ареал распространения *Wolbachia* существенно расширился с юга на север штата (Рис. 1.7) (Turelly, Hoffman, 1991; Turelly *et al.*, 1992). По результатам проведенного исследования частота инфицированности *Wolbachia* в популяциях этого региона в среднем составила 65 % с размахом значений от 32 до 98 %.

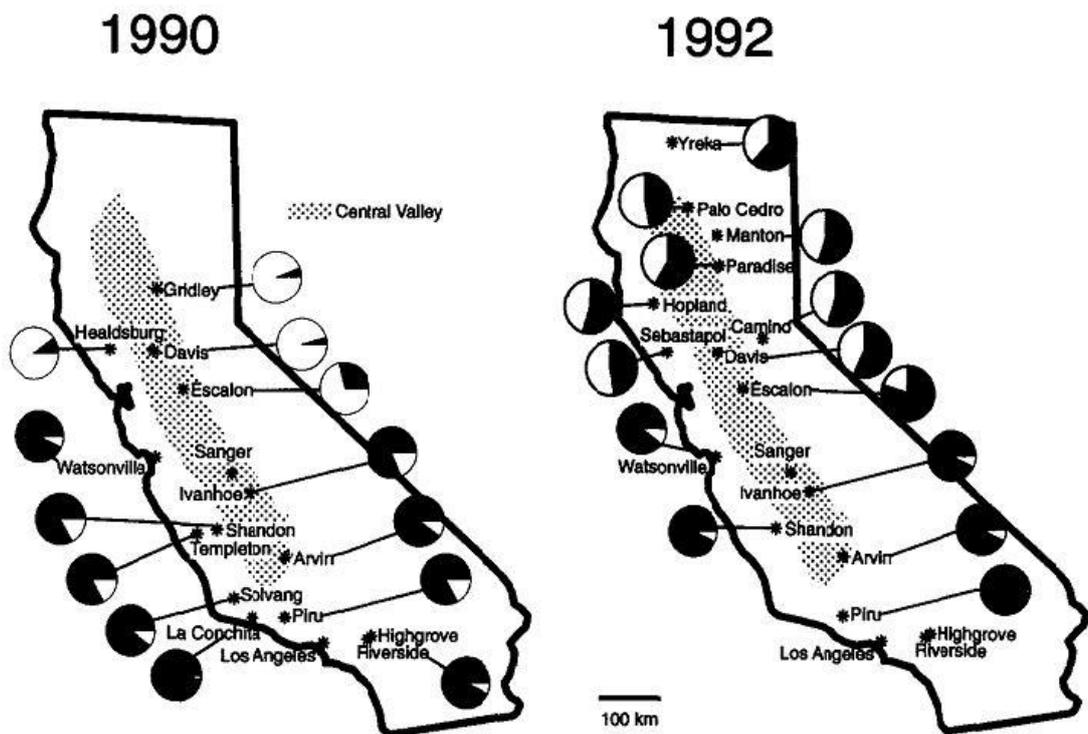


Рис. 1.7. Расположение калифорнийских популяций *D. simulans* в 1990 и 1992 гг. и оценка частоты инфекции. Заштрихованные части диаграмм – частоты инфекции (из Turelly, Hoffman, 1995).

Исследования частот инфицированности *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster* Австралии обнаружили их корреляцию с географическим расположением. В среднем частоты имели значения в диапазоне от 18 до 85 %, но для популяций южных регионов максимальные частоты не превышали 20 %, в то время, как в северных регионах они могли достигать почти 100 %. Предполагается, что частота инфицированности на севере Австралии всегда выше, чем в южных регионах (Hoffmann *et al.*, 1994, 1998).

Проведенные для популяций *D. melanogaster* Евразии исследования частот встречаемости *Wolbachia* выявили средний уровень инфицированности около 60 %, однако для различных популяций он может варьировать в широких пределах (от 15 до 100 %). Для популяций Алтая и Средней Азии были отмечены самые высокие уровни инфицированности – 56 и 64 %, соответственно. Для популяций Восточной Европы средний уровень инфицированности составил около 40 %. Следует особо подчеркнуть, что в ходе проведенных исследований популяции *D. melanogaster* Евразии не было выявлено ни одной неинфицированной *Wolbachia* популяции (Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский 2008).

Анализ генотипического разнообразия *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster* различных регионов мира показал, что наиболее распространенным из шести описанных генотипов бактерии является wMel (Riegler *et al.*, 2005; Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский 2008; Zakharov *et al.*, 2010; Ilinsky, 2013). Так, для популяций *D. melanogaster* Восточной Европы, частота особей, несущих *Wolbachia* генотипа wMel, в среднем составляет 96 %, для популяций Средней Азии – 80 %, а для популяций Алтая – 72 %. Также для евразийских популяций *D. melanogaster* было показано присутствие “редких” генотипов *Wolbachia* – wMelCS и wMelCS2 (Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский 2008).

1.9. Распространенность *Wolbachia* среди лабораторных линий *Drosophila melanogaster*

Несмотря на сравнительно хорошую изученность распространенности *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster*, имеется мало данных о разнообразии генотипов этой бактерии среди линий, поддерживающихся в фондах по всему миру. В то же время количество лабораторий и фондов, в которых проводятся исследования на *D. melanogaster* в мире остается очень высоким. Учитывая возможность влияния *Wolbachia* на организм вида-хозяина, необходимо учитывать статус инфицированности линий, используемых в экспериментальной работе. Первой попыткой оценки инфицированности лабораторных линий *Drosophila melanogaster* стала работа, в которой приводятся данные анализа распространенности *Wolbachia* среди линий одного из крупнейших фондов – Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC) в США (Clark *et al.*, 2005). Анализ проводился как для мутантных линий, так и для линий дикого типа, собранных в разные года в разных регионах мира, всего 609 линий. Было установлено, что общая доля инфицированных особей как среди мутантных, так и среди линий дикого типа примерно одинакова – 29 и 23 %, соответственно. Вариация уровня инфицированности между разными классами мутантных линий составила 10-45 %. Также была обнаружена разница уровня инфицированности как между группами с мутациями в различных хромосомах, так и внутри этих групп. В работе было показано, что среди линий, несущих летальные мутации в X-хромосоме, 60 % инфицированы *Wolbachia*. В то же время, уровень инфицированности у линий, несущих летальные мутации в хромосомах 2 и 3 составил всего 16 %. Также была обнаружена разница в количестве инфицированных особей между линиями-балансерами по X-хромосоме, линиями, несущими делеции или летальные мутации в X-хромосоме – 40, 12 и 60 %, соответственно. Однако авторы статьи обходятся без каких-либо

объяснений данных результатов. Также в данной работе не проводился анализ генотипического разнообразия *Wolbachia* среди инфицированных и митотипического разнообразия неинфицированных линий *D. melanogaster*.

1.10. Моделирование динамики инфицированности природных популяций *D. simulans* и *D. melanogaster* бактерией *Wolbachia*

Изменения уровня инфицированности популяций симбионтом *Wolbachia* напрямую связаны либо со степенью выраженности репродуктивных аномалий, индуцированных бактерией (Turelli, 1994; Werren, 1997a; Schoenmaker *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2000), либо с каким-либо мутуалистическим взаимодействием между *Wolbachia* и видом-хозяином. Для ЦН подобная взаимосвязь выражена особенно ярко: при высоком уровне ЦН инфицированность популяций высокая, а при низком может широко варьировать.

Также на частоту инфицированных особей в популяции может влиять такой фактор, как неполная материнская передача. Данное явление было описано для популяций *D. melanogaster* (Hoffman *et al.*, 1998). Оно заключается в том, что в потомстве инфицированной самки могут появиться неинфицированные особи. Подобный эффект может существенно уменьшить частоту инфекции в популяции, вплоть до ее полного «излечения» от *Wolbachia*.

На основании исследований природных популяций *D. simulans* Калифорнии, инфицированных *Wolbachia* штамма wRi, была предложена математическая модель для расчета динамики инфицированности (Hoffmann *et al.*, 1990):

$$p_{t+1} = \frac{p_t(1-\mu)(1-S_f)}{1-S_f p_t - S_h p_t(1-p_t) - \mu S_h p_t^2(1-S_f)}. \quad (1)$$

Данная модель учитывает наиболее важные факторы, которые могут влиять на изменения частоты инфекции в популяции: S_h – уровень несовместимости между неинфицированными и инфицированными особями, S_f – дефицит плодовитости, μ – уровень неполной материнской передачи. Зная значения этих параметров, а также частоту инфекции в момент времени t (p_t), становится возможным рассчитать частоту инфекции в следующий момент времени (p_{t+1}).

Основываясь на этой модели, была определена скорость распространения *Wolbachia* в калифорнийских популяциях *D. simulans*. Было установлено, что инфекция распространяется в популяции с очень большой скоростью: за год она может преодолеть расстояние более 100 км. Популяции, где инфекция встречалась очень редко, в течение трех лет оказались полностью инфицированы *Wolbachia* (Turelli, Hoffmann, 1991).

Позднее данную модель было предложено применить к популяциям *D. melanogaster* (Hoffmann *et al.*, 1998). Однако при расчете динамики инфицированности необходимо учитывать тот факт, что уровень ЦН в природных популяциях этого вида либо очень низкий, либо отсутствует вовсе. Следовательно, влиянием данного фактора на динамику инфицированности можно пренебречь. В этом случае модель (1) приобретает следующий вид:

$$p_{t+1} = \frac{p_t(1-\mu)(1-S_f)}{1-S_f p_t}. \quad (2)$$

Из данного уравнения следует, что, при наличии в популяции неполной материнской передачи μ и/или при колебаниях значения дефицита плодовитости S_f между 0 и 1, уровень инфекции должен снижаться вплоть до полной элиминации бактерии из популяции. Для *D. melanogaster* на основании

экспериментальных данных было установлено значение неполной материнской передачи на уровне 2-3 %, т.е. из 100 потомков инфицированной самки 2-3 особи будут неинфицированы. В отсутствие каких-либо других факторов, влияющих на частоту инфекции, при таком значении μ должно наблюдаться постепенное уменьшение доли инфицированных особей в популяции в течение 50 поколений с 50 до 14 % (Hoffmann *et al.*, 1998). Исходя из этих данных, а также учитывая тот факт, что частота инфицированности природных популяций *D. melanogaster* очень высока, было выдвинуто предположение о возможном мутуалистическом характере симбиоза *Wolbachia-D. melanogaster* (Hoffmann *et al.*, 1998).

1.11. Примеры мутуалистических взаимоотношений бактерии *Wolbachia* с разными видами

Широкая распространенность эндосимбиотической бактерии *Wolbachia* среди членистоногих и нематод обеспечивается в основном репродуктивными аномалиями, которые симбионт индуцирует у вида-хозяина. Однако для некоторых симбиотических систем *Wolbachia*–вид-хозяин показано мутуалистическое влияние бактерии.

Для сеноеда *Liposcelis tricolor* было показано, что удаление эндосимбионта *Wolbachia* приводит к существенному снижению приспособленности хозяина. В частности, наблюдается увеличение времени каждой стадии развития и уменьшение выживаемости незрелых особей. Также наблюдалось уменьшение плодовитости и продолжительности жизни свободных от *Wolbachia* особей, по сравнению с инфицированными (Dong *et al.*, 2007).

У комаров *Aedes albopictus* эндосимбионт *Wolbachia* вызывает ЦН. Однако для инфицированных самок бактерия дает преимущество, увеличивая

продолжительность жизни и количество откладываемых яиц. Также у инфицированных особей в совместимых скрещиваниях наблюдается больший уровень вылупляемости яиц (Dobson *et al.*, 2002).

У австралийской формы паразитической осы *Eretmocerus mundus* наблюдается индуцированный *Wolbachia* партеногенез. Обнаружено, что инфицированные самки приносят больше потомства в каждом поколении, чем неинфицированные (De Barro, Hart, 2001).

Мутуалистическое влияние *Wolbachia* обнаружено для вида постельного клопа *Cimex lectularius*, у которого, при удалении бактерии, наблюдается замедление роста и стерильность неинфицированных особей. Данные нарушения “исправляются” путем кормления особей витамином В, что подтверждает важную роль симбионта для хозяина (Nosokawa *et al.*, 2010).

Для паразитических ос *Asobara tabida* обнаружено влияние *Wolbachia* на оогенез. Самки, излеченные от бактерии антибиотиком, обнаруживали неспособность к продуцированию ооцитов и, соответственно, были неспособны к воспроизведению потомства. Для близкого *A. tabida* вида *Asobara citri*, не инфицированного *Wolbachia*, добавление в корм антибиотика не выявило влияния на способность к размножению. Не было выявлено каких-либо различий между инфицированными и излеченными особями *A. tabida* по фертильности самцов, двигательной активности и размеру особей (Dedeine *et al.*, 2001). Также для этого вида было обнаружено влияние бактерии на экспрессию ферритина, что может свидетельствовать о вовлечении *Wolbachia* в поддержание гомеостаза железа в организме хозяина (Kremer *et al.*, 2009).

Для *Drosophila simulans* описано мутуалистическое влияние *Wolbachia* штамма wHa, зависящее от митотипа хозяина (Dean, 2006). Этот штамм ассоциирован с митотипом siI *D. simulans* и вызывает слабо выраженную ЦН. Методом микроинъекций штамм wHa был введен особям, несущим другие

митотипы – siII и siIII, не ассоциированные в природе с исследуемым штаммом *Wolbachia*. Оказалось, что сильный мутуалистический эффект штамм wНа вызывает на генетическом фоне siIII у инфицированных особей по сравнению с неинфицированными, тогда как у особей siI и siII подобного эффекта не наблюдается (Dean, 2006).

Для популяций *D. simulans* Калифорнии показано, что присутствие бактерии увеличивает плодовитость инфицированных самок. Исследования показали, что, несмотря на наличие ЦН и сокращение плодовитости инфицированных самок на 15-20 %, ареал *Wolbachia* в калифорнийских популяциях *D. simulans* в течение 10 лет продвинулся более чем на 700 км. с юга на север региона. Было установлено, что характер взаимодействия между *Wolbachia* и видом-хозяином изменился в сторону более мутуалистического: плодовитость инфицированных самок увеличилась в среднем на 10 % по сравнению с неинфицированными (Turelli, Hoffmann, 1991; Weeks *et al.*, 2007).

Также было показано влияние различных штаммов *Wolbachia* у *D. simulans* на устойчивость к С-вирусу дрозофилы (*Drosophila C virus*, DCV). Обнаружено, что особи, несущие *Wolbachia* штамма wAu, при инфицировании DCV живут дольше, по сравнению с инфицированными другими штаммами. Продолжительность жизни таких мух достигала 30 дней после инфицирования DCV. Для штамма wRi продолжительность жизни хозяина составила всего 14 дней. Для штаммов wНа и wNo способности к антивирусной защите не показано и продолжительность жизни инфицированных и неинфицированных *Wolbachia* мух для них была одинакова (Osborne *et al.*, 2009).

У нематод *Wolbachia* выступает в роли облигатного мутуалиста, обеспечивая им нормальное размножение и развитие (Bandi *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2000a, b). Воздействие на нематод антибиотиками, такими, как доксициклин, тетрациклин и рифампицин снижает их плодовитость и угнетает

жизнеспособность (Hoerauf *et al.*, 1999, 2000; Rao *et al.*, 2002; Rajan, 2004). Также было установлено, что *Wolbachia* у нематод играет важную роль в биосинтезе пуринов и пиримидинов, а также обеспечивает хозяину необходимые метаболиты, такие, как рибофлавин, гемм и некоторые другие (Foster *et al.*, 2005; Haegeman *et al.*, 2009).

1.12. Факты мутуалистического взаимодействия в симбиотической системе *Wolbachia-Drosophila melanogaster*

Симбиотическая система «*Wolbachia-Drosophila melanogaster*» является одной из наиболее хорошо изученных, и представляет особый интерес, обусловленный несколькими факторами. Во-первых, для всех природных популяций *D. melanogaster* отмечено присутствие бактерии *Wolbachia* и очень высокие частоты инфицированности (Solignac *et al.*, 1994; Hoffmann *et al.*, 1994, 1998; Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский 2008). Во-вторых, описанная для этого вида ЦН, индуцируемая симбионтом, в природе либо отсутствует, либо проявляется на очень низком уровне (Hoffmann *et al.*, 1998). После разработки модели динамики распространения *Wolbachia* в природных популяциях, на основании популяционных исследований симбиотических взаимоотношений *Wolbachia-D. melanogaster*, было предположено, что бактерия должна предоставлять некоторое преимущество своему хозяину, поскольку уровень ЦН, наблюдаемый в природе, не способен объяснить столь широкое распространение симбионта в популяциях *D. melanogaster* (Hoffmann *et al.*, 1998). Были проведены различные исследования по поиску возможных фактов мутуалистического влияния *Wolbachia* на представителей данного вида.

Были проведены эксперименты по изучению влияния *Wolbachia* генотипа wMel на устойчивость *D. melanogaster* к недостатку пищи и температурному

стрессу (Harcombe, Hoffmann, 2004). В результате исследователями не было обнаружено значимого различия в жизнеспособности инфицированных и неинфицированных особей в условиях недостатка пищи. Также не было обнаружено влияния *Wolbachia* на конкуренцию личинок за корм в условиях голодного стресса. Влияние бактерии на устойчивость к температурному стрессу также не было установлено (Harcombe, Hoffmann, 2004).

При исследовании влияния бактерии на плодовитость и выживаемость *D. melanogaster* были получены противоречивые данные (Fry *et al.*, 2004). В эксперименте на выживаемость использовались 5 линий *D. melanogaster*. Для трех из них было показано достоверное увеличение продолжительности жизни инфицированных особей, по сравнению с неинфицированными. Однако для одной линии было показано уменьшение продолжительности жизни, тогда как для другой линии не было обнаружено влияния *Wolbachia* на продолжительность жизни. При исследовании влияния бактерии на плодовитость использовалось 4 линии *D. melanogaster*. В двух линиях было обнаружено, что неинфицированные самки достоверно менее плодовиты, чем инфицированные. В то же время, в третьей линии не было обнаружено значимого влияния бактерии на плодовитость. Для четвертой линии было показано наличие различия в динамике плодовитости: в определенный период наблюдалось увеличение плодовитости, однако в дальнейшем она возвращалась на уровень контроля. Ни для одной из исследованных линий не было обнаружено ЦН и наблюдаемые различия в поведении линий могут быть связаны с разницей их генетического фона.

В серии экспериментов по исследованию зависимости продолжительности жизни *D. melanogaster* от генотипа *Wolbachia* и температуры было установлено, что при экстремальных температурных условиях бактерия увеличивает продолжительность жизни и представлена,

чаще всего, генотипом wMel, наиболее распространенным в природных популяциях *D. melanogaster* (Вайсман и др., 2009).

Показана способность *Wolbachia* повышать устойчивость *D. melanogaster* к некоторым РНК-вирусам. С-вирус дрозофилы обнаруживается как в природных, так и в лабораторных популяциях *D. melanogaster* и является естественным патогеном у этого вида дрозофилид. Для неинфицированных *Wolbachia* особей *D. melanogaster* гибель взрослых особей после введения им DCV наступала на 4-6-й день. Продолжительность жизни мух, инфицированных *Wolbachia*, увеличивалась до 12-14 дней в результате замедленной сборки вирусных частиц DCV (Teixeira *et al.*, 2008). Помимо С-вируса, *Wolbachia* предоставляет *D. melanogaster* защиту от летального воздействия других РНК-вирусов, таких, как CrPV (*Cricket paralysis virus*) и FHV (*Flock House virus*) (Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008). Для ДНК-вирусов подобной защиты со стороны *Wolbachia* не выявлено.

Обнаружено влияние *Wolbachia* на систему сигнализации инсулиноподобного фактора роста (Insulin/IGF-like signalling, IIS). Данная система является эволюционно консервативной и выполняет различные функции у многоклеточных организмов. Мутации, уменьшающие активность IIS, могут иметь плеiotропный эффект на многие процессы, включая рост, развитие, метаболический гомеостаз, продолжительность жизни, стрессоустойчивость и плодовитость (Ikeya *et al.*, 2009). У мутантных по IIS линий *D. melanogaster* обнаруживалось уменьшение массы особей и плодовитости, в независимости от статуса инфицированности *Wolbachia*. Удаление бактерии приводило к еще более сильному уменьшению массы и плодовитости. Данный факт свидетельствует о том, что *Wolbachia* отвечает за повышение активности IIS (Ikeya *et al.*, 2009).

Показано влияние *Wolbachia* на линии *D. melanogaster*, несущие ген *chico*, кодирующий основу инсулинового рецептора, влияющего на регуляцию процессов роста. Существует два аллеля этого гена – *chi¹* и *chi²*. При удалении *Wolbachia* линии, гомозиготные по *chi²*, полностью летальны, в то время как на гомозиготных по *chi¹* мух отсутствие бактерии не оказывает значимого эффекта (Clark *et al.*, 2005). Механизм данного явления в настоящее время не изучен.

Ген *Sex-Lethal* (*Sxl*) у *Drosophila melanogaster* является важным переключателем геном в процессе соматического определения пола. Также он необходим для нормального оогенеза и мейотической рекомбинации. У гомозиготных самок, мутантных по аллелю *Sxl^{l⁴}*, яичники продуцируют такое же количество яйцеклеток, как и у немутантных особей. При воздействии тетрациклином на мух и, следовательно, удалении *Wolbachia*, в яичниках мутантных самок прекращается воспроизводство яйцеклеток, в то время, как у немутантных самок продукция яйцеклеток не изменяется. Таким образом, наличие *Wolbachia* у самок, мутантных по *Sxl^{l⁴}*, приводит к восстановлению способности к воспроизведению (Starr, Cline, 2002).

Несмотря на все вышеописанные факты мутуализма в системе *Wolbachia-D. melanogaster*, причины столь широкого распространения бактерии в природе остаются неизвестными, поскольку мутуалистическое влияние *Wolbachia* либо слабое, либо затрагивает редко встречаемые в популяциях генетические нарушения.

1.13. Другие эндосимбионты *Drosophila*

Бактерия *Wolbachia* является, пожалуй, наиболее важным и распространенным симбионтом представителей рода *Drosophila*. Помимо этой бактерии в популяциях дрозофилид распространена еще одна симбиотическая

бактерия – *Spiroplasma*. Она относится к классу микоплазм – протеобактерий, не имеющих клеточной стенки, и, так же, как и *Wolbachia*, передается вертикально в ряду поколений от самки к потомству (Anbutsu, Fukatsu, 2003). Данная бактерия хорошо известна как патоген некоторых растений и членистоногих (Haselkorn *et al.*, 2009). Анализ распространенности *Spiroplasma* среди 200 видов *Drosophila* выявил 16 инфицированных видов (Watts *et al.*, 2009). Уровень инфицированности отличается у разных видов. Так, у *D. simulans* из 106 проанализированных самок только одна была инфицирована бактерией, в то время как среди самцов инфицированных особей обнаружено не было. Для *D. wheeleri* присутствие *Spiroplasma* было показано для 58 % самцов и 50 % самок (Watts *et al.*, 2009).

Так же, как и *Wolbachia*, *Spiroplasma* влияет на репродукцию своего хозяина, однако, в отличие от *Wolbachia*, эта бактерия индуцирует только одну репродуктивную аномалию – андроцид. Обусловленный *Spiroplasma* андроцид описан для *D. melanogaster* и для некоторых представителей группы *Drosophila willistoni* (Montenegro *et al.*, 2005; Pool *et al.*, 2006; Osaka *et al.*, 2008). У некоторых видов показано присутствие *Spiroplasma*, не вызывающей андроцид (Anbutsu, Fukatsu, 2003). Для *D. hydei* обнаружено мутуалистическое влияние *Spiroplasma*: присутствие бактерии увеличивает продолжительность жизни особей, пораженных паразитической осой рода *Leptopilina* (Xie *et al.*, 2010). У *D. neotestacea* бактерия предоставляет защиту от негативного воздействия паразитической нематоды (Jaenike *et al.*, 2010). Исследования влияния *Spiroplasma* на плодовитость и выживаемость самок у *D. melanogaster* не выявили какого-либо значимого эффекта со стороны бактерии (Montenegro *et al.*, 2006). Обнаружено, что уровень материнской передачи *Spiroplasma* зависит от температуры. При низких температурах передача бактерии может полностью блокироваться (Osaka *et al.*, 2008).

1.14. Использование *Wolbachia* в биотехнологии

Широкая распространенность *Wolbachia* среди различных видов насекомых и нематод, а также ее способность индуцировать у вида-хозяина ЦН, обуславливают возможность использования бактерии для биологического контроля численности популяций насекомых-вредителей сельского хозяйства, переносчиков возбудителей различных заболеваний человека и животных, а также паразитических насекомых и нематод (Dong *et al.*, 2007; Bourtzis, 2008; Slatko *et al.*, 2010). Индуцированная *Wolbachia* ЦН может быть использована как непосредственный фактор контроля численности природных популяций членистоногих, представляющих интерес для экономики и здравоохранения, или же, как средство, обеспечивающее внедрение и распространение генетически модифицированных линий в популяциях членистоногих (Bourtzis, 2008).

Среди видов насекомых, для которых не описано ассоциации с *Wolbachia*, встречаются вредители сельского хозяйства, например, маслиная муха *Bactrocera oleae*, и переносчики различных заболеваний такие, как комары *Aedes aegypti* и *Anopheles gambiae*. В связи с этим разрабатываются методики возможного внедрения *Wolbachia* незараженному виду и создания устойчивой ассоциации вида-хозяина с бактерией.

В настоящее время природные механизмы переноса *Wolbachia* от одного вида к другому не известны. Тем не менее, возможно провести искусственное инфицирование, путем микроинъекции бактерий в цитоплазму клеток эмбриона неинфицированного вида и, таким образом, получить новые инфицированные линии (Boyle *et al.*, 1993; Braig *et al.*, 1994; Giordano *et al.*, 1995; Clancy, Hoffman, 1997; Poinso *et al.*, 1998; Rousset *et al.*, 1999; Sasaki, Ishikawa, 2000; Charlat *et al.*, 2002; McGraw *et al.*, 2002; Rigler *et al.*, 2004; Zabalou *et al.*, 2004a, b; Xi *et al.*, 2005). На использовании микроинъекций

основана Техника несовместимости насекомых (Incompatible Insect Technique, ИТ), которая предполагает использование ЦН или же других репродуктивных аномалий, индуцированных *Wolbachia*, для контроля популяций насекомых-вредителей. Впервые подобная техника была предложена для изучения несовместимости популяций европейской вишневой мушки *Rhagoletis cerasi* (Boiler, Bush, 1974; Boiler *et al.*, 1976). *Wolbachia*, обнаруженная у этого вида, путем эмбриональной микроинъекции была введена другому виду – средиземноморской плодовой мушке *Ceratitis capitata*, являющейся важным сельскохозяйственным вредителем (Robinson *et al.*, 1989; Zabalou *et al.*, 2004b). Спустя 50 поколений после инъекции две трансинфицированные (инфицированы разными штаммами *Wolbachia*) линии показали стабильность сохранения бактерии и 100 %-уровень передачи инфекции. Тестовые скрещивания между неинфицированными самками и инфицированными самцами показали тотальную гибель потомства. В реципрокном скрещивании уровень эмбриональной гибели колебался между 16 и 32 %. При скрещивании линий с разными штаммами бактерии наблюдалась полная двунаправленная ЦН (Zabalou *et al.*, 2004b).

Комары *Aedes aegypti* являются переносчиками возбудителя лихорадки денге, и не относится к инфицированным *Wolbachia* видам (Xi *et al.*, 2005). Был проведен эксперимент по переносу *Wolbachia* этому виду от природно-инфицированных комаров *Aedes albopictus*. В результате было обнаружено закрепление штамма wAlb от *A. albopictus* в популяции *A. aegypti*. Тестовые скрещивания показали 100 %-уровень ЦН: из более чем 3,8 тыс. яиц, полученных в скрещивании неинфицированной самки с инфицированным самцом, не было получено ни одного потомка (Xi *et al.*, 2005). Данные опыты показывают, что бактерия может быть экспериментально перенесена новому хозяину, минуя генетические барьеры, и формировать устойчивые ассоциации, для которых наблюдается полная одно- и двунаправленная ЦН.

Эти данные поддерживают концепцию внедрения *Wolbachia* в популяции насекомых-вредителей и переносчиков заболеваний с целью уменьшения их численности (Zabalou *et al.*, 2004b; Xi *et al.*, 2005).

Помимо ЦН, для биологической борьбы с различными насекомыми-вредителями и переносчиками заболеваний могут также использоваться патогенное влияние *Wolbachia* и мутуалистические взаимоотношения бактерии и вида-хозяина.

Для *Drosophila melanogaster* описан патогенный штамм *Wolbachia* wMelPop, который приводит к снижению продолжительности жизни мух (Min, Benzer, 1997). В ходе исследований аналогичное патогенное влияние было обнаружено среди ракообразных. Данный факт может свидетельствовать о существовании подобных патогенных штаммов *Wolbachia* среди других видов членистоногих. В связи с этим было предложено использование данных штаммов для борьбы с насекомыми-переносчиками заболеваний (Sinkins, O'Neill, 2000). Известно, например, что комары *Anopheles stephensi* переносят возбудителей малярии – *Plasmodium falciparum*. Для развития плазмодия до стадии, способной к инфицированию, ему требуется некоторое время провести в организме комара, поэтому только достаточно взрослые особи способны передать инфекцию. Если патогенный штамм *Wolbachia* внедрить в популяцию *Anopheles*, то продолжительность жизни комаров сократится, что означает уменьшение уровня передачи инфекции. Но здесь следует заметить, что такие штаммы не могут существенно влиять на репродуктивную способность комаров, поскольку не будут оказывать должного эффекта на молодое поколение, которое вносит большой вклад в воспроизведение популяции (Sinkins, O'Neill, 2000). В дальнейшем для *Anopheles stephensi* был предложен другой метод борьбы с малярией. Был проведен эксперимент по переносу *Wolbachia* штамма wAlb от *Aedes albopictus* в эмбрионы *Anopheles stephensi*. В одной изосамочьей линии было обнаружено стабильное

поддержание *Wolbachia* в течение 34 последовательных поколений (Bian *et al.*, 2013). Показано, что штамм wAlb вызывает у *An. stephensi* сильную ЦН, а также проявляет полную материнскую передачу. Было установлено, что бактерии в организме хозяина подавляют развитие *Plasmodium falciparum*, что является прорывом в области борьбы с малярией (Bian *et al.*, 2013).

Мутуалистическое влияние *Wolbachia* на хозяина может быть использовано для борьбы с такими вредителями, как сенокосы (отряд Psocoptera). Представители этого отряда встречаются повсеместно и могут быть обнаружены в продуктах питания, различных складах и хранилищах. Также являются вредителями семенных культур, поскольку вызывают повреждения семенных ядер. Для одного из представителей Psocoptera – *Liposcelis tricolor* – было показано снижение приспособленности после удаления *Wolbachia* воздействием антибиотиков (Dong *et al.*, 2007).

Большое внимание в использовании мутуалистических взаимоотношений *Wolbachia* со своими хозяевами уделяется симбиотической ассоциации данной бактерии с филярийными нематодами, вызывающими у человека такие заболевания, как речная слепота, слоновость и другие филяриозы. Облигатный эндосимбиоз *Wolbachia* с нематодами делает бактерию важной целью при терапии подобных заболеваний (Slatko *et al.*, 2010). Воздействие на нематод антибиотиками угнетает их плодовитость и снижает жизнеспособность (Hoerauf *et al.*, 1999, 2000; Rao *et al.*, 2002; Rajan, 2004). Также обнаружено, что производное альбендазола – альбендазолсульфон – уменьшает концентрацию *Wolbachia* в клетках нематоды *Brugia malai* (Serbus *et al.*, 2012).

Исследования симбиотических ассоциаций *Wolbachia* с различными видами членистоногих и нематод, в свете возможного использования данной бактерии как биологического агента для борьбы с различными вредителям сельского хозяйства, переносчиками заболеваний, а также паразитами человека, очень важны. Они также предоставляют новые данные, позволяющие лучше понять механизмы симбиотических взаимоотношений в природе.

Большое количество исследований взаимоотношений *Wolbachia* с видами-хозяевами проведено на популярном модельном объекте генетики – плодовой мушке *Drosophila melanogaster*. Природные популяции *D. melanogaster* по всему миру инфицированы *Wolbachia*, которая представлена, в основном, тремя генотипами - wMel, wMelCS и wMelCS2. Из них самым распространенным является wMel, для которого частота инфицированности популяций составляет более 90 %. До сих пор остается открытым вопрос о причинах столь широкого распространения бактерии в природе, поскольку описанная для *D. melanogaster* ЦН крайне низкая, а обнаруженные факты положительного влияния *Wolbachia* на хозяина не достаточно сильны, чтобы обеспечивать поддержание бактерии.

В данной работе проведена оценка частот инфицированности природных популяций *D. melanogaster* симбиотической бактерией *Wolbachia*, а также анализ генотипического разнообразия бактерии и митотипического разнообразия *D. melanogaster*. Проведено изучение динамики инфицированности экспериментальных популяций *D. melanogaster* бактерией *Wolbachia* на примере двух распространенных в природе генотипов бактерии – wMel и wMelCS. Осуществлена попытка определения факторов, влияющих

на изменения в динамике инфицированности экспериментальных популяций, на основании описанной в литературе математической модели. Полученные данные позволят установить возможные причины широкого распространения *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster*.

Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Сборы из природных популяций

Для анализа распространенности эндосимбиотической бактерии *Wolbachia* в природных популяциях *Drosophila melanogaster* были использованы изосамочки линии, полученные от оплодотворенных в природе самок из популяций 8 регионов Евразии за период с 2008 по 2013 гг. (табл. 2.1). Сборы проводились с использованием энтомологического эксгаустера и ловушек. Всего было создано и проанализировано 836 изосамочьих линий *D. melanogaster*.

Из мух каждой линии выделяли ДНК, методом ПЦР определялся статус инфицированности линии. Для неинфицированных образцов определялся митотип (гаплотип митохондриальной ДНК) *D. melanogaster*. Для *Wolbachia*-положительных образцов проводилось определение генотипа бактерии. В качестве контрольных образцов использовались ранее охарактеризованные по статусу инфицированности и генотипу *Wolbachia* линии мух.

Таблица 2.1. Места сборов и количество взятых в анализ линий из природных популяций *Drosophila melanogaster* период в 2008-2013 гг.

Регион	Год	Количество исследованных линий
Западная Сибирь (Новосибирск)	2008	57
Алтай (Бийск)	2008	29
Алтай (с. Черга и с. Иогач)	2008	45
Узбекистан (Ташкент)	2008	16
Украина (Умань)	2008	16
Кабардино-Балкария (Нальчик)	2010	85
Украина (Алушта, Крым)	2010	55
Украина (с. Изобильное, Крым)	2010	223
Франция (Монпелье)*	2010	18
п-ов Синай (Египет)	2010	24
Западная Сибирь (Томск)	2011	17
Кабардино-Балкария (Нальчик)	2012	103
Украина (Умань)	2012	12
Украина (Киев)	2012	13
Швеция (Гётеборг)	2012	57
Кабардино-Балкария (Нальчик)	2013	66

* - Линии предоставлены P.R. Haddrill.

2.2 Коллекция лабораторных линий *Drosophila melanogaster*

Для изучения распространенности и генотипического разнообразия *Wolbachia* среди лабораторных линий была использована коллекция лабораторных мутантных линий *Drosophila melanogaster* из фонда лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН. Всего было

проанализировано 353 мутантные линии из 8 групп, определенных либо по локализации мутации либо по типу мутации: «хромосома 1» (118 линий), «yellow» (22), «хромосома 2» (77), «lethal giant larvae» (17), «хромосома 3» (82), «хромосома 4» (6), «транслокации» (8), «мультихромосомная» (23). Полный список использованных в работе линий опубликован на стр. 407-415 в статье: Илинский Ю. Ю., Быков Р. А., Захаров И. К. «Цитотипы мутантных линий *Drosophila melanogaster* фонда лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН: генотипы эндосимбионта *Wolbachia* и митотипы вида-хозяина» Вавиловский журнал генетики и селекции, 2013, Т. 17, №3, С. 404-423.

2.3 Выделение ДНК

Выделение ДНК проводилось по стандартной методике с модификациями (Marmur, 1961). В пробирку, объемом 1,5 мл, помещались предварительно умерщвленные самки *Drosophila melanogaster* и добавлялось 200 мкл экстрагирующего буфера (10 mM Трис-НСl (pH 8.0), 25 mM ЭДТА, 0,5 % SDS, 0,1 M NaCl). При определении статуса инфицированности природных популяций и лабораторных линий из каждой изосамочьей линии отбирались 3-4 самки. В эксперименте по исследованию динамики инфицированности ящичных популяций для выделения ДНК в каждую пробирку помещали по одной самке. Каждый образец гомогенизировали индивидуальным пестиком, после чего проводили инкубацию при 56°C в течение часа. Осаждение белков проводили 100 мкл буферного раствора ацетата калия (2M уксусной кислоты, 3M ацетата калия) в течение 30 мин. при температуре 4°C. ДНК осаждали добавлением 400 мкл 96 % этилового спирта и затем отмывали 90 мкл 70 % этилового спирта. Растворяли ДНК в 50 мкл бидистиллированной воды. Полученные образцы хранились в морозилке при -20°C.

2.4 Полимеразная цепная реакция

Для определения статуса инфицированности использовались праймеры, специфичные к бактериальным генам *16SrRNA* и *wsp*. Определение генотипа бактерии для инфицированных образцов проводили с использованием праймеров, специфичных к пяти маркерам генома *Wolbachia* (рис. 1.6): двум локусам встройки инсерционной последовательности IS5, двум минисателлитным повторам VNTR и инверсии в локусе WD0394-WD0541 (табл. 2.2).

Для определения митотипа *Drosophila melanogaster* использовался полиморфизм по однонуклеотидной замене в позиции 2187 в гене первой субъединицы цитохромоксидазы относительно аннотированной ранее последовательности полного генома мтДНК линии Oregon-R, номер GenBank NC001709. Полиморфизм по этому сайту является одним из наиболее информативных для идентификации гаплотипов митохондриальной ДНК, сопряженных с двумя наиболее распространенными генотипами *Wolbachia*. Были использованы аллель-специфичные праймеры: 2187 snp-mel для варианта «2187-T» (сонаследование с wMel и подобными ему генотипами *Wolbachia*); и 2187 snp-cs/cs2 для варианта «2187-C» (сонаследование с генотипами wMelCS/wMelCS2) (Илинский, 2008). В качестве обратного праймера использовался COIR1 (табл. 2.2).

Условия ПЦР для каждого набора праймеров приведены в таблице 2.3.

Все ПЦР-продукты разделяли в 1-1,5 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, в буфере 1×TBE (TRIS 0,089M, кислота борная 0,089M, ЭДТА 0,002M) при напряженности поля 3 В/см.

Таблица 2.2. Список использованных в работе праймеров.

Аmplифицируемый продукт	Праймер
Определение статуса инфицированности	
Ген поверхностного белка <i>Wolbachia</i> , <i>wsp</i>	81F 5`-TGGTC-CAATA-AGTGA-TGAAG-AAAC-3` 691R 5`-AAAAA-TTAAA-CGCTA-CTCCA-3`
Ген <i>16SrRNA Wolbachia</i>	99F 5`-TTGTA-GCCTG-CTATG-GTATA-ACT-3` 994R 5`-GAATA-GGTAT-GATTT-TCATG-T-3`
Определение генотипа <i>Wolbachia</i>	
VNTR-141 <i>Wolbachia</i>	F 5`-GGAGT-ATTAT-TGATA-TGCG-3` R 5`-GACTA-AAGGT-TAGTT-GCAT-3`
VNTR-105 <i>Wolbachia</i>	F 5`-GCAAT-TGAAA-ATGTG-GTGCC-3` R 5`-ATGAC-ACCTT-ACTTA-ACCGT-C-3`
IS5-WD0516/7 <i>Wolbachia</i>	F 5`-CCATC-AAGGT-CTCTT-TCA-3` R 5`-TGCAA-GGAAA-ACTAA-ACCAG-3`
IS5-WD1310 <i>Wolbachia</i>	F 5`-AGGAG-AACTG-GTCTA-CGC-3` R 5`-TGTTG-CTGAG-CTTTG-CT-3`
Инверсия WD0394-WD0541 <i>Wolbachia</i>	F 5`-AAGTC-TGTCA-CGGTT-GAG-3` R 5`-GTAAA-AGATG-CAGTA-AAGG-3`
Определение митотипа	
COIR1 <i>D.melanogaster</i>	R5`-GAGTT-CCATG-TAAAG-TAGC-3`
2187 snp-mel	F5`-GCG-TTT-GAT-TTT-TTG-GTG-AT-3`
2187 snp-cs/cs2	F5`-GCG-TTT-GAT-TTT-TTG-GTG-AC-3`

Таблица 2.3. Условия ПЦР для использованных в работе наборов праймеров.

Праймер	Количество циклов	Первичная денатурация (94°C)	Для каждого цикла			Финальная элонгация (72°C)
			денатурация (94°C)	отжиг праймеров (55°C)	элонгация (72°C)	
IS5-WD1310	35	3 мин	15 сек	40 сек	2 мин	1,5 мин
IS5-WD0516/7	35	4 мин	10 сек	40 сек	2 мин	2 мин
VNTR-105, VNTR-141	35	4 мин	12 сек	40 сек	1,5 мин	2 мин
Инверсия WD0394-WD0541	35	2 мин	15 сек	30 сек	4 мин	9 мин
2187snp-mel 2187snp-cs/cs2	27	2 мин	15 сек	30 сек	30 сек	-

2.5 Постановка эксперимента по анализу динамики инфицированности ящичных популяций *Drosophila melanogaster*

Для эксперимента по анализу динамики инфицированности экспериментальных популяций *D. melanogaster* были выбраны четыре линии мух из фонда лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН: Vi90 (Бишкек, 2004 г., инфицирована *Wolbachia* генотипа wMel, митотип «M»), w153 (Ташкент, 1989 г., инфицирована *Wolbachia* генотипа wMelCS, митотип «S»), Vi90T (неинфицирована, митотип «M») и w153T (неинфицирована, митотип «S»). Неинфицированные линии были получены из инфицированных путем содержания мух на корме с 0,03 % тетрациклина в течение двух поколений (Илинский, Захаров, 2009). Данные линии не заражены какими-либо вирусами и не несли мутаций, влияющих на жизнеспособность. Для того чтобы получить выровненный генетический фон, были проведены реципрокные скрещивания между линиями Vi90 и w153, и линиями Vi90T и w153T по следующей схеме: (1) ♀ Vi90 × ♂ w153, (2) ♀ w153 × ♂ Vi90, (3) ♀ Vi90T × ♂ w153T и (4) ♀ w153T × ♂ Vi90T.

Потомки данных скрещиваний были идентичны по генетическому фону и отличались только по цитотипу (митотип *D. melanogaster* и наличие (генотип)/отсутствие *Wolbachia*): (1) *M-Mel*, (2) *S-CS*, (3) *M-w⁻*, (4) *S-w⁻*, где *M* и *S* – митотипы *D. melanogaster*, *Mel* и *CS* – генотипы *Wolbachia wMel* и *wMelCS*, соответственно, *w⁻* – отсутствие *Wolbachia*. Из потомства от каждого скрещивания проводился отбор самцов и девственных самок, которых, до закладки эксперимента, содержали отдельно на изюмном корме при 16°C не более 3 суток.

Далее полученные линии были использованы для создания четырех экспериментальных ящичных популяций, контрастных по цитоплазматическому фону (рис. 2.1). Каждая популяция изначально состояла из 300 самок и 200 самцов (150 самок и 100 самцов от линии-основательницы). Первая популяция содержала особей с цитотипами *M-Mel* и *S-CS*, вторая – из особей с цитотипами *M-Mel* и *S-w⁻*, в третьей популяции содержались особи с цитотипами *S-CS* и *M-w⁻*, а четвертая популяция состояла из неинфицированных особей с цитотипами *M-w⁻* и *S-w⁻*.

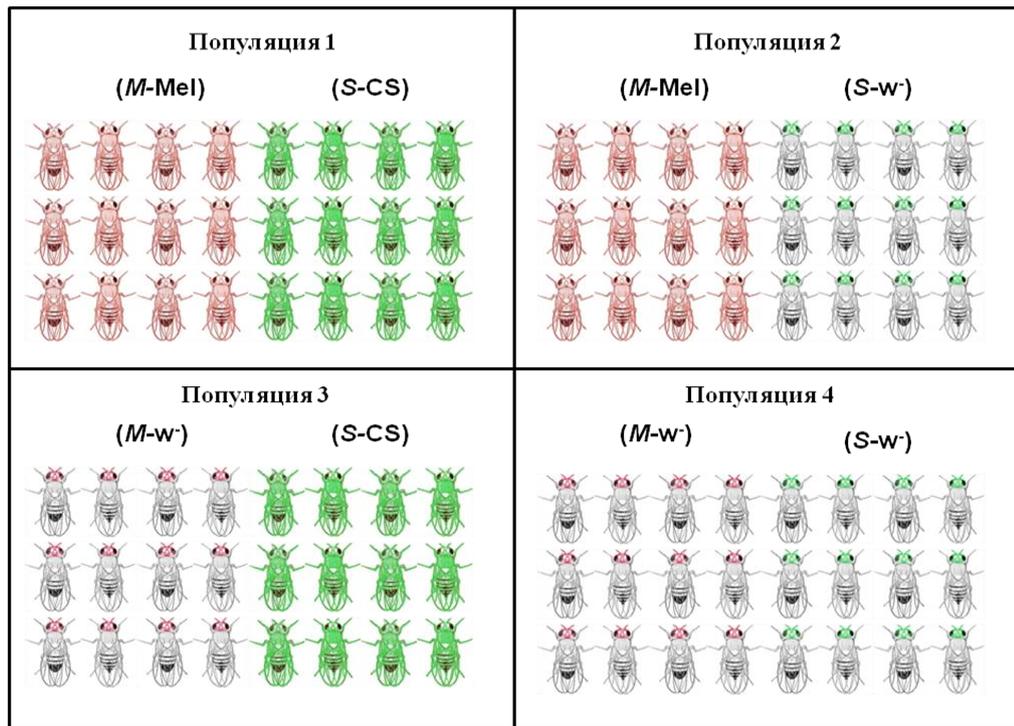


Рис. 2.1. Схема постановки экспериментальных популяций *D. melanogaster*. В скобках указаны цитотипы использованных линий.  – особи, инфицированные *Wolbachia* генотипа wMel;  – особи, инфицированные *Wolbachia* генотипа wMelCS;  – неинфицированные особи с *M*-митотипом;  – неинфицированные особи с *S*-митотипом.

2.6 Ход эксперимента

После закладки эксперимента по изучению динамики инфицированности экспериментальных популяций *D. melanogaster* бактерией *Wolbachia* разных генотипов в каждый популяционный ящик с периодичностью в 2-3 дня в течение недели помещалось по 15 пробирок с кормом (состав на 5 л. воды: агар-агар – 32 г., дрожжи сухие – 120 г., крупа манная – 180 г., сахар – 180 г. На 1 литр готовой среды – 2 мл нипагина). Мухи содержались при постоянной температуре 25°C. Пробирки с отложенными яйцами переставлялись в новые популяционные ящики. Эксперимент продолжался в течение 20 поколений,

при этом первые 11 поколений не перекрывались между собой. Сбор мух из популяционных ящиков осуществлялся при помощи эксгаустера, особи разделялись по полу, подсчитывались, фиксировались в 96 % этиловом спирте и помещались на хранение при -20°C . Было собрано, и зафиксировано в спирте 27907 самок и 25844 самца, всего 53751 особь из 11 неперекрывающихся между собой поколений мух из каждого популяционного ящика, а также 20-го поколения, полученного после 11-го свободным скрещиванием дрозофил перекрывающихся поколений.

Для анализа инфицированности *D. melanogaster* бактерией *Wolbachia* методом ПЦР брались выборки, в количестве 60 – 120 самок. Анализ ДНК каждой отдельной самки проводился с использованием праймеров, специфичных к встройке инсерционной последовательности IS5 в локус WD1310 генома *Wolbachia* (табл. 2.2), благодаря которым можно различить генотипы wMel и wMelCS (рис. 1.6). Для всех неинфицированных особей проводился анализ митотипа в целях, во-первых, установить пригодность выделенной ДНК для анализа и, во-вторых, для выявления особей, утративших бактерию.

Достоверность отличий частот инфицированности между поколениями оценивалась с помощью критерия χ^2 .

Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Инфицированность природных популяций *Drosophila melanogaster* Евразии симбиотической бактерией *Wolbachia*

Проведен анализ инфицированности внутриклеточной бактерией *Wolbachia* 836 изосамочьих линий *Drosophila melanogaster* из природных популяций различных регионов. Наиболее представлены выборки из популяций Украины (41 %) и Кабардино-Балкарии (30,4 %). Инфекция была выявлена во всех исследованных популяциях. Доля инфицированных особей варьировала от 30 до 100 % и в среднем составила 64 % (табл. 3.1).

Самые высокие частоты инфицированности отмечены для популяций Томска (100 %), Швеции, Узбекистана и п-ова Синай (по 88 %). Наиболее низкие частоты обнаружены в популяциях Алтая (49 %), Украины (49 и 42 %), и Франции (33 %).

Таблица 3.1. Инфицированность природных популяций *D. melanogaster* Евразии симбиотической бактерией *Wolbachia*. Линии из фонда лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН.

Регион	Год сбора	Число линий	Доля инфицированных, %	Доля неинфицированных, %
Западная Сибирь (Новосибирск, Россия)	2008	57	67	33
Западная Сибирь (Томск, Россия)	2011	17	100	0
Алтай (Бийск, Россия)	2008	29	72	28
Алтай (с. Черга и с. Иогач, Россия)	2008	45	49	51
Украина (Умань)	2008	16	75	25
Украина (Алушта, Крым)	2010	55	49	51
Украина (с. Изобильное, Крым)	2010	223	58	42
Украина (Умань)	2012	12	42	58
Украина (Киев)	2012	13	85	15
Кабардино-Балкария (Нальчик, Россия)	2010	85	72	28
Кабардино-Балкария (Нальчик, Россия)	2012	103	59	41
Кабардино-Балкария (Нальчик, Россия)	2013	66	67	33
Узбекистан (Ташкент)	2008	16	88	12
п-ов Синай (Египет)	2010	24	88	12
Франция (Монпелье)*	2010	18	33	57
Швеция (Гётеборг)	2012	57	88	12

* Линии предоставлены P.R. Haddrill.

3.2 Генотипическое разнообразие *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster* Евразии

Анализ генотипического разнообразия *Wolbachia* среди инфицированных линий выявил существенное преобладание генотипа wMel (в среднем 97,2 %), который, с разной частотой, был обнаружен во всех проанализированных популяциях (табл. 3.2). Наибольшая частота данного генотипа – 100 %, была зафиксирована в выборке из популяции Томска. Также высокая частота генотипа wMel *Wolbachia* была отмечена в выборках из популяций Швеции (88 % от общего объема выборки), Киева (85 %) и Ташкента (81 %). В ходе исследования в некоторых популяциях нами были обнаружены редкие генотипы *Wolbachia*. Так, генотип wMelCS был зафиксирован в популяциях Республики Алтай (1 линия, 2,2 % от общего объема выборки) и Узбекистана (1 линия, 6,2 %). Генотип wMelCS2 был зафиксирован в шести случаях: в двух популяциях с Украины (суммарно 4 линии, 1,4 %) и в двух популяциях из Кабардино-Балкарии (по 1 линии, 9 и 15 %).

В ходе анализа выборки из популяции *D. melanogaster* с полуострова Синай (Египет) для 7 линий из 24 на электрофореграмме было обнаружено отличие размера ПЦР-продукта с праймера на тандемные повторы VNTR-141 от контрольных генотипов *Wolbachia* wMel и wMelCS. Новый сигнал наблюдался на уровне около 1000 п.н., что не соответствует уровням сигналов для генотипа wMel (около 1300 п.н.) и wMelCS (1200 п.н.) (рис.3.1). Было сделано предположение о том, что количество повторов VNTR-141 в данном случае меньше, чем у описанных генотипов *Wolbachia*. В результате последующего секвенирования было обнаружено, что количество повторов VNTR-141 у нового генотипа составляет 5, в то время как у других генотипов их число составляет 6 или 7. Новый генотип был обозначен как wMel4 (Pinsky, 2013).

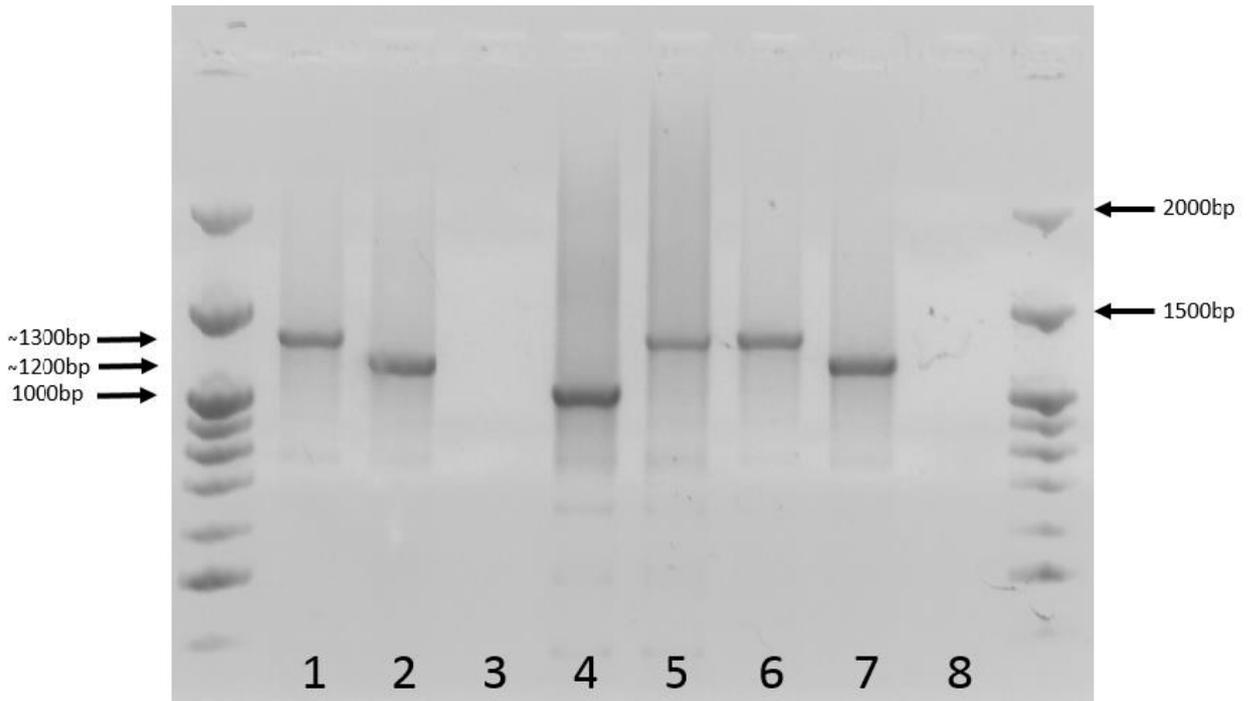


Рис. 3.1. Электрофоретический спектр ампликонов для маркера VNTR-141. 1, 5, 6 – положительный контроль, генотип *Wolbachia* wMel; 4 – линия с п-ова Синай, новый генотип *Wolbachia*; 2, 7 – генотип *Wolbachia* wMelCS; 3, 8 – отрицательный контроль. Маркер 100 пн + 1,5 тпн + 2 тпн.

3.3 Разнообразие митотипов *Drosophila melanogaster* в природных популяциях

Во всех популяциях, кроме популяции из Ташкента, присутствовали неинфицированные особи. Для линий, полученных от этих особей, был проведен анализ однонуклеотидной замены в позиции 2187 митохондриального генома *D. melanogaster* (см. раздел 1.7.4) с целью определения митотипа. Наиболее распространенным оказался митотип *M* (98,6 % среди неинфицированных, 35 % от общего числа линий). Самая высокая частота неинфицированных особей с данным митотипом была зафиксирована в выборке 2010 года из популяции Франции (67 % от объема выборки) и в выборке 2012 года из популяции Умани, Украина (58 %). Стоит

отметить, что в выборке 2008 г. из популяции Умани число неинфицированных линий составило всего 25 % от общего объема выборки (табл. 3.2). В целом, для всех проанализированных сборов с Украины частота неинфицированных особей с митотипом *M* варьирует от 15 до 58 %. В популяциях из Нальчика (Кабардино-Балкария) были обнаружены 4 неинфицированные линии с митотипом *S*. Одна линия (1,2 % от общего объема) была обнаружена в выборке 2010 г. и 3 линии (2,9 %) – 2012 г. По частоте митотипа *M* данные выборки отличаются незначительно – 27 и 38 %, соответственно.

Таблица 3.2. Генотипическое разнообразие *Wolbachia* и митотипическое разнообразие *D. melanogaster* в природных популяциях Евразии. Приведены данные опубликованных работ: Илинский, Захаров, (2007а, б), Илинский (2008).

* – звездочкой отмечены данные, полученные в ходе выполнения данной работы.

Регион, популяция, год сбора	Число линий	Инфицировано (генотип <i>Wolbachia</i>)				Неинфици- ровано (митотип)
		wMel	wMelCS	wMelCS2	wMel4	
Дальний Восток						
Владивосток, 1982	1	-	-	-	-	1
Восточная Сибирь						
Улан-Удэ, 1988	1	-	-	-	-	1
Улан-Удэ, 2005	26	17	-	-	-	9
Алтай						
Бийск, 1992	20	6	1	3	-	10
Горно-Алтайск, 1992	1	-	-	1	-	-
Поспелиха, 1992	25	5	4	7	-	9
Янтарный, 1992	19	7	-	4	-	8
Бийск, 1993	17	6	-	3	-	8
Горно-Алтайск, 1993	20	6	-	1	-	13
Асгат, 2000	20	8	-	1	-	11
Белокуриха, 2000	20	13	-	-	-	7
Чемал, 2003	15	12	-	-	-	3
* Бийск, 2008	29	21	-	-	-	8 (M)
*с. Черга и с. Июгач, 2008	45	21	1	-	-	23 (M)
Западная Сибирь						
Новосибирск, 2003	7	3	-	-	-	4
* Новосибирск, 2008	57	38	-	-	-	19 (M)
* Томск, 2011	17	17	-	-	-	-
Кыргызстан						
Каракол, 1992	1	1	-	-	-	-
Бишкек, 2001	1	1	-	-	-	-
Бишкек, 2004	21	11	-	4	-	6
Бишкек, 2005	47	36	-	-	-	11
Камышановка, 2005	20	13	-	2	-	5

Таблица 3.2. (продолжение)

Каракол, 2005	24	5	-	-	-	19
Казахстан						
Алма-Ата, 1985	1	-	-	-	-	1
Алма-Ата, 1988	1	-	-	-	-	1
Алма-Ата, 1989	1	1	-	-	-	-
Семипалатинск, 2002	1	1	-	-	-	-
Таджикистан						
Душанбе, 1985	1	-	-	1	-	-
Душанбе, 1988	1	-	-	-	-	1
Душанбе, 1990	8	1	-	4	-	3
Узбекистан						
Ташкент, 1981	1	-	-	-	-	1
Ташкент, 1984	1	-	-	1	-	-
Самарканд, 1985	1	1	-	-	-	-
Ташкент, 1989	2	1	1	-	-	-
Ташкент, 2001	9	2	-	3	-	4
Ташкент, 2005	20	8	1	4	-	7
* Ташкент, 2008	16	13	1	-	-	2 (М)
Урал						
Бирск, 1974	1	1	-	-	-	-
Челябинск, 1991	1	1	-	-	-	-
Удмуртия						
Ижевск, 2000	1	1	-	-	-	-
Карамбай, 2000	2	-	-	-	-	2
Пычас, 2000	1	1	-	-	-	-
Пычас, 2001	1	1	-	-	-	-
Ижевск, 2002	1	-	-	-	-	1
Армения						
Ленинаван, 1988	1	-	-	-	-	1
Кабардино-Балкария						
Нальчик, 1989	1	1	-	-	-	-
Нальчик, 1992	1	1	-	-	-	-
Нальчик, 1997	2	2	-	-	-	-
* Нальчик, 2010	85	61	-	-	-	24 (23 - М, 1 - S)
* Нальчик, 2012	103	60	-	1	-	42 (39 - М, 3 - S)
* Нальчик, 2013	66	43	-	1	-	22 (22 - М)
Кавказ						
Краснодар, 1978	1	-	-	-	-	1

Таблица 3.2. (продолжение)

Анапа, 1979	1	-	-	-	-	1
Кировобад, 1979	1	-	-	-	-	1
Тбилиси, 1981	1	-	-	-	-	1
Краснодар, 1982	1	-	-	-	-	1
Геленджик, 1983	1	-	-	-	-	1
Краснодар, 1985	1	1	-	-	-	-
Краснодар, 1988	1	-	-	-	-	1
Тбилиси, 1989	1	-	-	1	-	-
Пицунда, 1991	1	1	-	-	-	-
Краснодар, 1992	2	1	-	-	-	1
Сочи, 2004	17	11	-	6	-	-
Брянская область						
Брянск, 1987	1	-	-	-	-	1
Белоруссия						
Гомель, 1980	1	-	-	1	-	-
Барановичи, 1986	1	-	-	-	-	1
Брест, 1986	1	-	-	-	-	1
Пинск, 1986	1	-	-	-	-	1
Брестская обл., 1988	1	-	-	-	-	1
Витебск, 1989	1	-	-	-	-	1
Украина						
Умань, 1979	1	-	-	-	-	1
Умань, 1981	1	-	-	-	-	1
Магарач, 1982	1	1	-	-	-	-
Ужгород, 1982	1	-	-	-	-	1
Кеменчуг, 1983	1	1	-	-	-	-
Магарач, 1984	1	-	-	-	-	1
Умань, 1984	15	4	-	-	-	11
Киев, 1985	1	1	-	-	-	-
Умань, 1985	1	1	-	-	-	-
Запорожье, 1986	1	1	-	-	-	-
Одесса, 1986	1	1	-	-	-	-
Ужгород, 1986	1	-	-	-	-	1
Умань, 1986	1	-	-	-	-	1
Чернобыль, 1986	1	-	-	-	-	1
Умань, 1987	11	5	-	-	-	6
Бахчисарай, 1988	1	1	-	-	-	-
Умань, 1988	12	1	-	1	-	10
Одесса, 1989	1	1	-	-	-	-

Таблица 3.2. (продолжение)

Умань, 1989	8	4	-	-	-	4
Харьков, 1989	1	1	-	-	-	-
Запорожье, 1990	1	-	-	-	-	1
Умань, 1990	27	12	-	-	-	15
Умань, 1991	18	9	-	-	-	9
Умань, 1993	17	3	-	-	-	14
Звенигородка, 1997	1	1	-	-	-	-
Никополь, 1997	1	1	-	-	-	-
Звенигородка, 2003	20	8	-	-	-	12
Никополь, 2003	21	6	-	-	-	15
Умань, 2003	20	14	-	-	-	6
Черкасы, 2003	1	-	-	-	-	1
Умань, 2004	20	3	-	-	-	17
Ялта, Крым, 2005	46	11	-	-	-	35
Киев, 2007	6	6	-	-	-	-
Полесское, 2007	11	7	-	-	-	4
Умань, 2007	15	11	-	-	-	4
Чернобыль – Озеро, 2007	27	17	-	-	-	10
Чернобыль - Яблоневый Сад, 2007	6	3	-	-	-	3
* Умань, 2008	16	12	-	-	-	4 (М)
* Алушта, Крым, 2010	55	26	-	1	-	28 (М)
* Изобильное, Крым, 2010	223	127	-	3	-	93 (М)
* Киев, 2012	13	11	-	-	-	2 (М)
* Умань, 2012	12	5	-	-	-	7 (М)
Молдавия						
Кишинев, 1983	1	1	-	-	-	-
Кишинев, 1984	1	-	-	1	-	-
п-ов Синай						
* Египет, 2010	24	14	-	-	7	3 (М)
Швеция						
* Гётеборг, 2012	57	50	-	-	-	7 (М)
Польша						
Неизвестно, 1992	1	-	-	-	-	1
Болгария						
Албена, 1986	1	-	-	-	-	1

Таблица 3.2. (продолжение)

ГДР						
Берлин, 1988	1	-	-	-	-	1
Неизвестно, 1989	2	-	-	-	-	2
Франция						
* Монпелье, 2010	18	6	-	-	-	12 (М)
ВСЕГО:	1566	849	9	55	7	646 (292 – М, 4 – S, 350 – не определялось)

3.4 Цитотипическое разнообразие лабораторных линий *Drosophila melanogaster*

В ходе анализа распространенности *Wolbachia* среди мутантных линий фонда лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН было обнаружено, что 39 % из них являются носителями *Wolbachia* (Илинский и др., 2013). Наблюдаются отличия в уровне инфицированности между разными группами линий. Среди наиболее представленных групп («хромосома 1», «хромосома 2» и «хромосома 3») наибольшее число инфицированных линий имеет группа «хромосома 2» – 53 %, а группы «хромосома 2» и «хромосома 3» инфицированы на 29 %. Для оставшихся малочисленных групп показатель инфицированности варьировал от 33 до 68 % (табл. 3.3.).

Анализ генотипического разнообразия *Wolbachia* среди инфицированных линий показал присутствие трех генотипов бактерии: wMel (60 линий), wMelCS2 (65) и wMelCS (13), при этом группы линий отличались между собой по соотношению данных генотипов. В группе «хромосома 1» наиболее представленным оказался редко встречающийся в природных популяциях генотип *Wolbachia* wMelCS2 – 26 линий. В то же время, наиболее распространенный генотип wMel был определен только для 6 линий и еще 2 линии были инфицированы *Wolbachia* wMelCS-генотипа. В группе «хромосома 2» число линий, инфицированных бактерией генотипов wMel и wMelCS2, оказалась примерно одинаковым – 18 и 21, соответственно, и также 2 линии несли *Wolbachia* генотипа wMelCS. В группе «хромосома 3» наибольшее количество линий, а именно 18, являлось носителями wMel-генотипа *Wolbachia*. В двух случаях был определен wMelCS2-генотип бактерии и еще в четырех – wMelCS. Среди «малочисленных» групп «lethal giant larvae», «хромосома 4» и «yellow» полностью отсутствовали линии,

инфицированные *Wolbachia* wMelCS-генотипа, а в «мультихромосомной» группе обнаружили все три генотипа бактерии.

Таблица 3.3. Инфицированность бактерией *Wolbachia* линий *Drosophila melanogaster* фонда Лаборатории генетики популяций Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН (г. Новосибирск) (Илинский и др., 2013)

Группа мутантных линий	Исследовано линий	Число инфицированных линий			
		генотип <i>Wolbachia</i>			%
		wMel	wMelCS2	wMelCS	
Хромосома 1	117	6	26	2	29
Хромосома 2	77	18	21	2	53
Хромосома 3	82	18	2	4	29
Хромосома 4	6	1	2	0	50
Транслокации	8	2	0	1	38
Мультихромосомная	24	1	3	4	33
<i>yellow</i>	22	13	2	0	68
<i>lethal giant larva</i>	17*	1	9	0	59
Всего	353	60	65	13	39

* одна линия включена в состав группы «хромосома 2».

Помимо анализа инфицированности было также проведено определение митотипа как инфицированных, так и неинфицированных линий. На основании однонуклеотидного полиморфизма 37С/Т однозначно определяется принадлежность каждой линии к *M*- или *S*-кладе мтДНК (см. 1.7.4.). Было обнаружено, что среди мутантных лабораторных линий преобладают линии *S*-клады – 62 %, а доля линий *M*-клады составляет только 38 %. Под цитотипом подразумевается совокупность компонент материнской наследственности: митотипа вида-хозяина и статуса инфицированности

бактерией *Wolbachia* с учетом генотипа симбионта. Исследование показало наличие среди линий фонда четырех цитотипов: *M-MEL*, *M-w*, *S-CS*, *S-w* (табл. 3.4.). Наибольшее число линий – 40 %, представлено цитотипом *S-w*. Частота встречаемости оставшихся трех цитотипов варьирует от 17 до 22 %.

Таблица 3.4. Цитотипы мутантных линий *Drosophila melanogaster* фонда Лаборатории генетики популяций Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН (г. Новосибирск)

Группа	Число линий	Цитотип			
		<i>M-MEL</i>	<i>M-w</i>	<i>S-CS</i>	<i>S-w</i>
Хромосома 1	117	6	12	28	70
Хромосома 2	77	18	14	23	22
Хромосома 3	82	18	26	6	32
Хромосома 4	6	1	1	2	2
Транслокации	8	2	2	1	3
Мультихромосомная	24	1	5	7	11
yellow	22	13	6	2	1
lethal giant larva*	17	1	5	9	1
ВСЕГО	353	60	71	78	142

* - для двух линий митотип не определен, поскольку они погибли до проведения анализа.

3.5 Динамика цитотипов *Drosophila melanogaster* в экспериментальных популяциях

В ходе эксперимента по анализу частот цитотипов в экспериментальных популяциях *D. melanogaster* была отслежена динамика численности каждой популяции по поколениям (табл. 3.5).

Таблица 3.5. Динамика численности мух в экспериментальных популяциях. В скобках указано количество самок/самцов.

Поколение	Популяция			
	1	2	3	4
0	430 (250 / 180)	438 (257 / 281)	426 (271 / 155)	448 (264 / 184)
1	928 (509 / 419)	505 (259 / 246)	435 (184 / 251)	670 (306 / 364)
2	586 (230 / 356)	955 (429 / 526)	1056 (594 / 462)	1006 (478 / 528)
3	490 (288 / 202)	425 (295 / 130)	628 (378 / 250)	475 (288 / 187)
4	440 (254 / 186)	419 (253 / 166)	462 (268 / 194)	377 (211 / 166)
5	1254 (565 / 689)	1267 (641 / 626)	1020 (344 / 676)	1258 (567 / 691)
6	1355 (575 / 780)	1477 (761 / 716)	1493 (698 / 795)	1591 (832 / 759)
7	910 (454 / 456)	844 (460 / 384)	967 (531 / 436)	913 (523 / 390)
8	1312 (637 / 675)	1228 (693 / 535)	1383 (626 / 757)	1087 (546 / 541)
9	670 (348 / 322)	1082 (566/516)	1127 (594/533)	1111 (561/550)
10	1674 (841 / 833)	1750 (903 / 847)	1938 (968 / 970)	1640 (807 / 833)
11	692 (446 / 246)	2131 (1088 / 1043)	807 (442 / 365)	1536 (759 / 777)
20	1666 (958 / 708)	1709 (1027 / 682)	1532 (848 / 684)	1728 (1032 / 696)

На динамику цитотипов в экспериментальных популяциях могут влиять такие факторы, как температура (Harcombe, Hoffmann, 2004; Вайсман и др., 2009; Versache *et al.*, 2014), недостаток пищи (Harcombe, Hoffmann, 2004), некоторые РНКовые вирусы (Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008) и мутации в отдельных генах (Starr, Cline, 2002; Clark *et al.*, 2005; Ikeya *et al.*, 2009), разница в плодовитости линий (Fry *et al.*, 2004), а также индуцированная *Wolbachia* ЦН и неполная материнская передача бактерии (появление неинфицированных особей в потомстве инфицированной самки). Часть факторов была исключена нами при постановке эксперимента (см. разделы 2.1, 2.2), однако условиями эксперимента мы не могли исключить ЦН, неполную материнскую передачу бактерии, а также возможную разницу в плодовитости самок. Таким образом, данные факторы могли влиять на динамику исследуемых цитотипов. Исходя из этого, было возможно использовать для анализа экспериментальных данных ранее предложенную в литературе математическую модель (Hoffmann *et al.*, 1990; Turelly *et al.*, 1992):

$$p_{t+1} = \frac{p_t(1-\mu)F}{1 - p_t(1-F) - S_h p_t(1-p_t) - \mu F S_h p_t^2}. \quad (3)$$

Изначально она была применена для расчета динамики частоты инфицированности в природных популяциях *D. simulans* и в ней учтены уровень ЦН (S_h), относительная плодовитость инфицированных самок по сравнению с неинфицированными (F) и уровень неполной материнской передачи (μ).

В ходе проведенного исследования нами не было зафиксировано фактов утраты бактерии среди потомков инфицированных самок – т.е., неполной материнской передачи (табл. 3.6). Следовательно, влиянием этого фактора на динамику генотипов *Wolbachia* в экспериментальных популяциях можно пренебречь. Тогда формула (3) приобретает вид

$$p_{t+1} = \frac{Fp_t}{1 - p_t(1 - F) - S_h p_t(1 - p_t)}. \quad (4)$$

Соответственно, в проведенном эксперименте на динамику цитотипов могли влиять два фактора – ЦН и плодовитость.

Таблица 3.6. Инфицированность исследуемых экспериментальных популяций *Drosophila melanogaster* бактерией *Wolbachia* двух генотипов за весь период проведения эксперимента.

Популяция	Число особей	Инфицировано (генотип <i>Wolbachia</i>)		Неинфицировано (митотип)	
		wMel	wMelCS	<i>M</i>	<i>S</i>
1	885	628	257	0	0
2	930	524	0	0	406
3	824	0	541	283	0
4	319	0	0	269	50

Из литературных данных известно, что ЦН в популяциях *D. melanogaster* находится в пределах от 10 до 20 % (Hoffmann *et al.*, 1994; Илинский, 2008; Илинский, Захаров, 2009). В то же время, точных данных о том, предоставляет ли *Wolbachia* репродуктивное преимущество для инфицированных особей, в литературе нет. Если рассматривать только влияние ЦН, а плодовитость особей с разным цитотипом считать одинаковой ($F = 1$), то формула (4) приобретет следующий вид:

$$p_{t+1} = \frac{p_t}{1 - S_h p_t(1 - p_t)}. \quad (5)$$

Аналогично можно рассмотреть ситуацию, при которой бактерия не вызывает ЦН, но предоставляет репродуктивное преимущество хозяину. В

$$\text{этом случае формула (4) примет вид } p_{t+1} = \frac{Fp_t}{1-p_t(1-F)}. \quad (6)$$

Поскольку границ для значения относительной плодовитости F в литературе нет, мы предполагаем их аналогичными для значения S_h – 10 % ($F = 1,1$) и 20 % ($F = 1,2$).

На рисунках 3.2 и 3.3 приведены графики, построенные на основании формул (5) и (6) и отражающие динамику распространения одного цитотипа от изначального соотношения 1:1 при значениях $S_h = 0,1$, $S_h = 0,2$ и $F = 1,1$, $F = 1,2$ на протяжении 100 поколений.

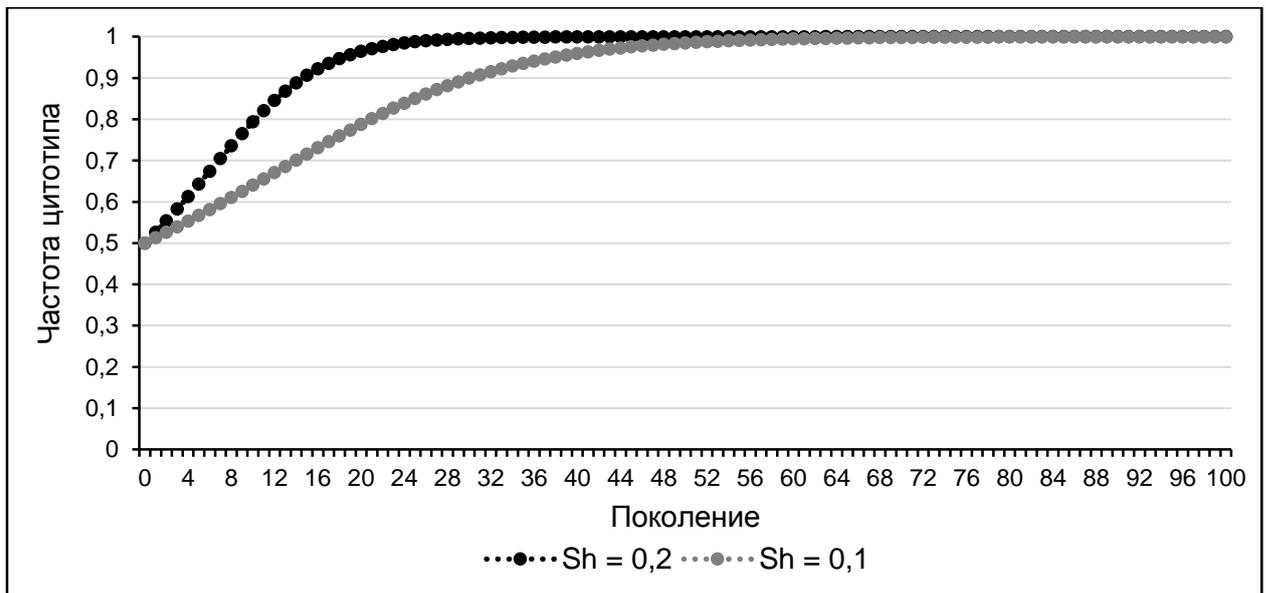


Рис. 3.2. Динамика цитотипов *D. melanogaster* при уровне ЦН 10 % ($S_h = 0,1$) и 20 % ($S_h = 0,2$).

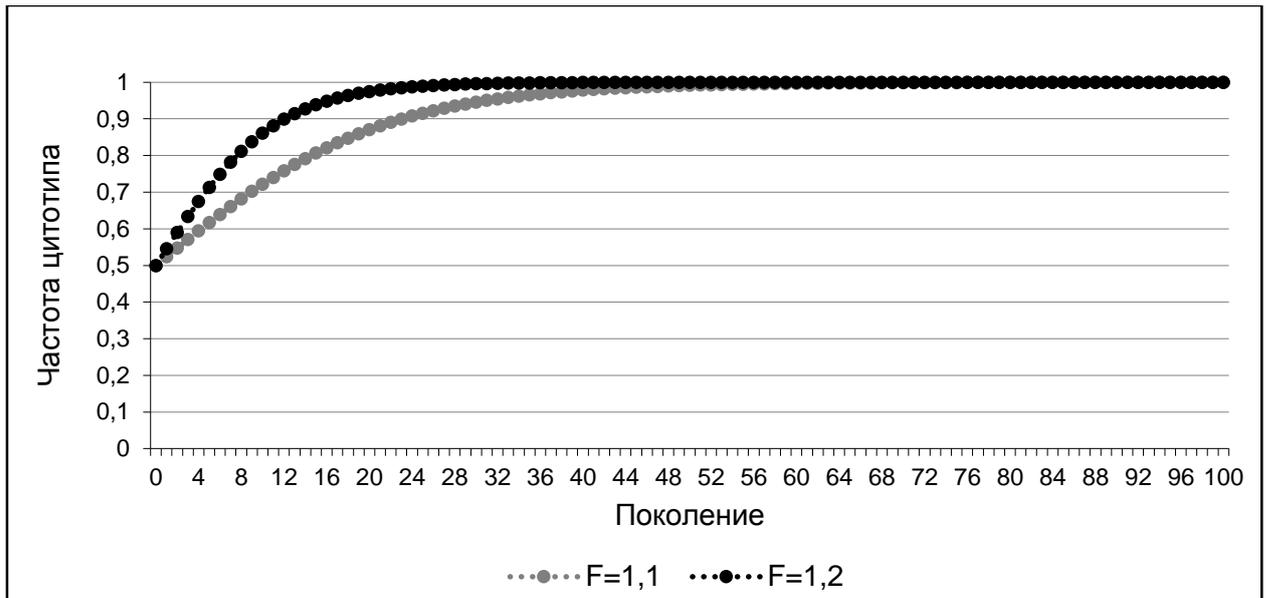


Рис. 3.3. Динамика цитотипов *D. melanogaster* при 10 % ($F = 1,1$) и 20 % ($F = 1,2$) разнице в плодовитости особей с разными цитотипами.

Очевидно, что при действии только одного фактора ЦН, доля одного из цитотипов будет увеличиваться до фиксации, которая наступает в 70-м поколении при уровне ЦН 20 %. При более низких значениях S_h фиксация соответственно будет происходить позднее. Аналогичная ситуация будет наблюдаться при существовании репродуктивного преимущества самок с одним цитотипом над самками с другим цитотипом, однако фиксация в данном случае будет происходить позже, по сравнению с данными для ЦН. Так, при значении $F = 1,2$ фиксация одного цитотипа наступит в 80-м поколении. Для 11-го и 20-го поколений, являющихся ключевыми точками проведенного эксперимента, доля одного из цитотипов на основании теоретических данных должна составлять 88 и 97 % при значении $F = 1,2$ и 82 и 96 % при значении $S_h = 0,2$. Для $F = 1,1$ эти значения составляют 74 и 87 %, а для $S_h = 0,1$ — 66 и 79 %.

Если же в популяции будет наблюдаться и ЦН, и разница в плодовитости, то их влияние будет суммироваться, что приведет к еще более быстрой

фиксации одного из цитотипов. Сопоставим теоретические графики с данными, полученными в ходе эксперимента.

Изначально рассмотрим четвертую популяцию, которая использовалась как контроль без *Wolbachia* (рис. 3.4).

При постановке эксперимента мы предполагали, что в отсутствие *Wolbachia* соотношение цитотипов в контрольной популяции не будет изменяться в течение всего эксперимента. Однако в ходе исследования мы обнаружили достоверное увеличение ($p < 0,001$) доли особей, несущих цитотип *M-w* до 90 % уже во втором поколении. Наблюдаемый результат мог бы свидетельствовать о преимуществе особей, несущих цитотип *M-w*, по сравнению с особями с цитотипом *S-w*. Однако в последующих поколениях мы не наблюдаем фиксации частот цитотипов и в 20-м поколении доля особей с цитотипом *M-w* сохраняется на уровне 90 %, что соответствует нашим изначальным предположениям об отсутствии изменений частот цитотипов в контрольной популяции. Мы провели повторную постановку данной популяции при тех же условиях с теми же линиями (рис. 3.5). В ходе анализа динамики цитотипов было обнаружено аналогичное увеличение в первом поколении доли особей с цитотипом *M-w* до уровня 67 % ($p < 0,01$), а на протяжении последующих пяти проанализированных поколений соотношение цитотипов не изменялось. На основании полученных данных мы предполагаем, что наблюдаемые резкие изменения частот цитотипов в первых двух поколениях обусловлены влиянием случайных факторов.

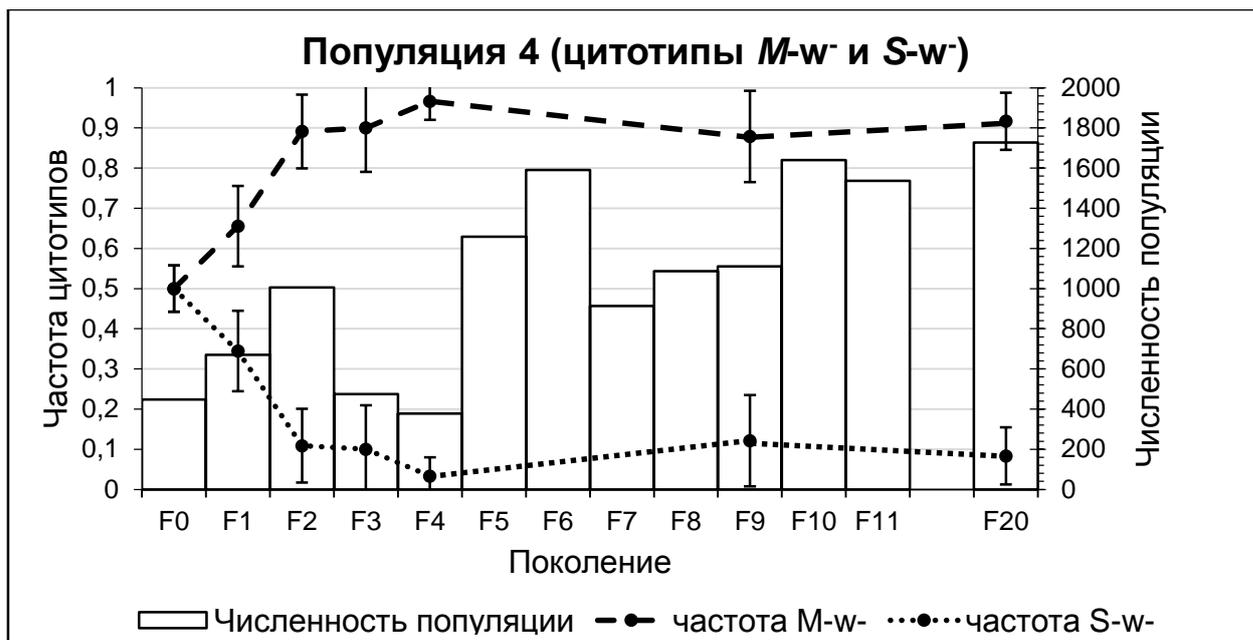


Рис. 3.4. Динамика изменения частот цитотипов *D. melanogaster* по поколениям в четвертой популяции.

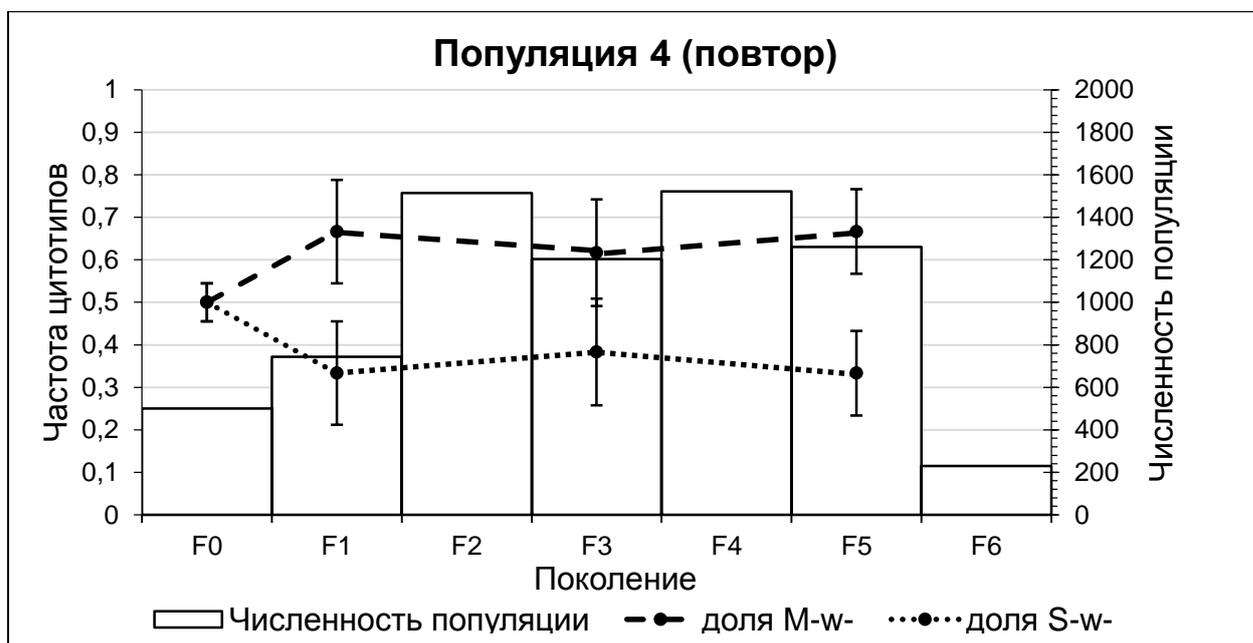


Рис. 3.5. Динамика изменения частот цитотипов при повторе схемы эксперимента для 4-й не инфицированной *Wolbachia* популяции.

Следовательно, мы можем не рассматривать влияние митотипа *D. melanogaster* на динамику частот цитотипов в оставшихся инфицированных

Wolbachia популяциях. Однако стоит учитывать тот факт, что изменения частот могут происходить резко.

В первой экспериментальной популяции половина особей несла цитотип *M-MEL* (инфицирована *Wolbachia* генотипа *wMel*), другая половина – цитотип *S-CS* (*Wolbachia* генотипа *wMelCS*). В ходе проведенного анализа инфицированности особей бактерией *Wolbachia* было обнаружено, что к 11-му поколению в популяции достоверно увеличилась ($p < 0,001$) доля особей, несущих бактерию генотипа *wMel* до уровня 83 % (рис. 3.6). Наблюдаемое изменение соответствует данным из природных популяций, в которых преобладает *Wolbachia* генотипа *wMel* (Riegler *et al.*, 2005; Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский 2008; Zakharov *et al.*, 2010; Ilinsky, 2013). Однако при анализе динамики было обнаружено, что начиная с четвертого поколения соотношение цитотипов достоверно не изменялось и в 20-м поколении снизилось до уровня 76 %, который был зафиксирован еще в четвертом поколении.

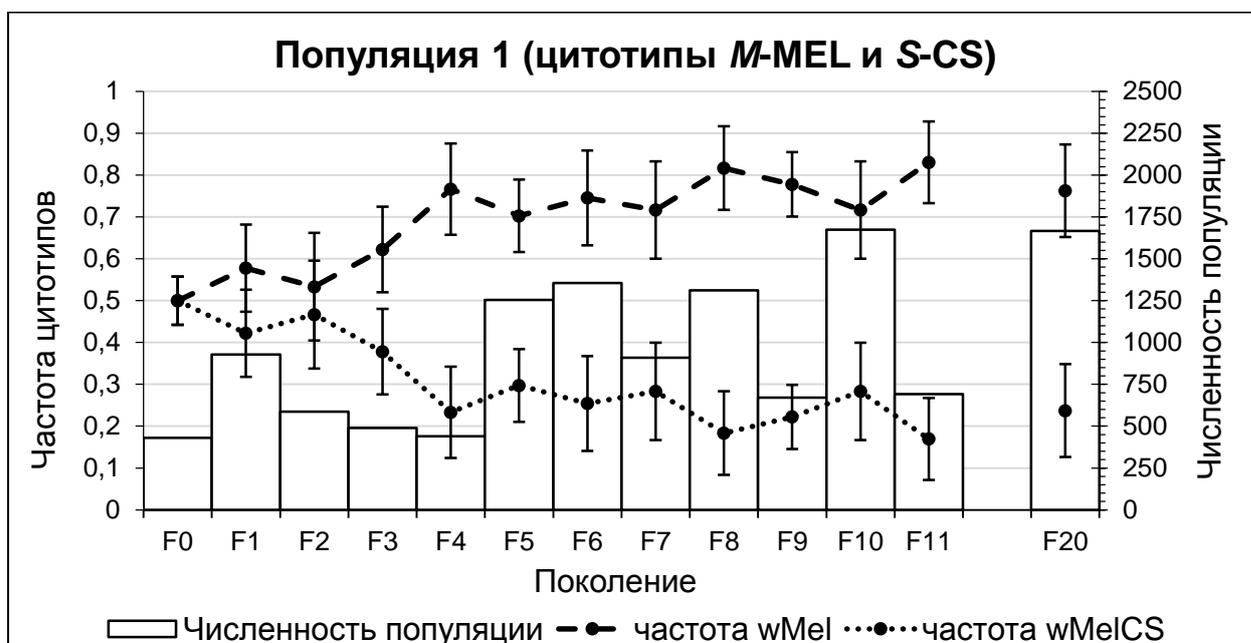


Рис. 3.6. Динамика изменения частот цитотипов *D. melanogaster* в первой экспериментальной популяции.

Достоверных изменений частот цитотипов мы не обнаружили и между первыми двумя поколениями: несмотря на незначительное увеличение доли особей с цитотипом *M-MEL* до 58 % в первом поколении, ко второму поколению их доля снизилась до 53 %.

Наибольшие изменения произошли в третьем и четвертом поколениях, когда доля *D. melanogaster* с цитотипом *M-MEL* резко увеличилась с 53 до 77 %. Подобную динамику мы наблюдали в контрольной популяции, где в первых поколениях произошло резкое увеличение доли особей с митотипом «*M*». Вероятно, что и в случае первой популяции такое резкое изменение частот цитотипов также может быть результатом действия генетического дрейфа. Таким образом, мы можем предполагать, что в первой популяции не произошло обусловленных влиянием *Wolbachia* достоверных изменений частот цитотипов.

Мы не рассматриваем в данной популяции влияние ЦН, поскольку в литературе нет данных о том, что между генотипами *Wolbachia* *wMel* и *wMelCS* существует несовместимость. Из других возможных факторов в данном варианте эксперимента может существовать различие в плодовитости особей, несущих *Wolbachia* разных генотипов. Рассмотрим, как соотносятся экспериментальные данные с теоретическими для случая, когда особи с одним генотипом бактерии более плодовиты, чем особи, несущие бактерию другого генотипа (рис. 3.7).

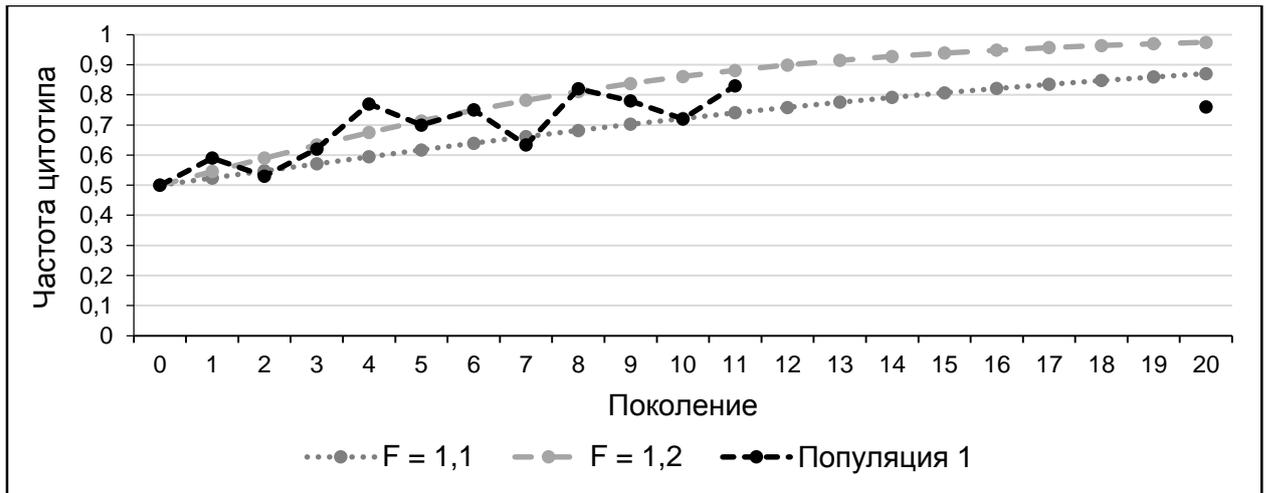


Рис. 3.7. Сравнение теоретической и наблюдаемой динамики *D. melanogaster*, инфицированных *Wolbachia* генотипа wMel, в первой экспериментальной популяции в течение 20 поколений при разных значениях относительной плодовитости F .

Как следует из рис. 3.7, почти все полученные в эксперименте значения попадают в область между теоретическими кривыми, соответствующими предполагаемым границам для значений относительной плодовитости F . В этом случае данное значение будет показывать, во сколько раз самки, инфицированные *Wolbachia* генотипа wMel, более или менее плодовиты, по сравнению с самками, несущими *Wolbachia* генотипа wMelCS. Таким образом, можно предположить, что *Wolbachia* генотипа wMel может давать репродуктивное преимущество инфицированным самкам, по сравнению с генотипом wMelCS. На основании сравнения графиков на рис. 3.7 можно предположить, что значение F для рассматриваемой экспериментальной популяции находится на уровне около 1,15, т.е. самки, инфицированные *Wolbachia* генотипа wMel на 15 % более плодовиты, чем инфицированные бактерией генотипа wMelCS. Однако, несмотря на то, что в 11-м поколении доля особей с *Wolbachia* генотипа wMel близка к теоретической (83 и 88 %, соответственно), к 20-му поколению в эксперименте мы не наблюдаем её повышения, как это происходит в тории. Полученное в эксперименте значение

в 76 % оказывается ниже теоретически предсказанных 87 %. Следовательно предположение о различии в плодовитости особей, отличающихся генотипом бактерии *Wolbachia* не верно. Таким образом, мы предполагаем, что генотипы *Wolbachia* wMel и wMelCS не отличаются между собой по влиянию на репродуктивную способность *D. melanogaster*, а наблюдаемые резкие изменения частот цитотипов в первой экспериментальной популяции обусловлены влиянием генетического дрейфа.

Во второй и третьей экспериментальных популяциях мы проводим сравнение динамики инфицированных и неинфицированных *Wolbachia* особей. Следовательно обе популяции отражают распространение инфекции и их можно рассмотреть совместно (рис. 3.8). Во второй популяции мухи были инфицированы *Wolbachia* генотипа wMel, а в третьей – wMelCS.

Как во второй, так и в третьей популяциях к 11-му поколению произошло достоверное увеличение ($p < 0,001$) доли инфицированных особей, по сравнению с изначальным соотношением до 83 и 78 %, соответственно. Полученные значения инфицированности соответствуют данным из природных популяций, в которых доля инфицированных особей также высока (Solignac *et al.*, 1994; Hoffmann *et al.*, 1994, 1998; Vesprool, Haddrill, 2011; Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский 2008). При анализе динамики мы обнаружили, что во второй популяции в течение первых трех поколений частота цитотипа M-MEL достоверно снижается до уровня 27 % ($p < 0,001$) (рис. 3.8 А). В четвертом поколении уровень инфицированности резко возрастает до 58 % и в пятом поколении остается на том же уровне. В то же время, в третьей популяции в течение первых пяти поколений не было зафиксировано достоверных изменений частот цитотипов (рис. 3.8 Б) и в пятом поколении соотношение частот цитотипов осталось на изначальном уровне. После пятого поколения во второй популяции не происходит достоверного изменения соотношения частот цитотипов до 11-го поколения, в

котором уровень инфицированности достигает максимума в 83 %, что полностью соответствует теоретическому значению 82 % (рис. 3.8 А). Однако в 20-м поколении уровень инфицированности снижается до 65 % в отличие от теоретических данных, исходя из которых он должен был возрасти минимум до 79 %.

В третьей популяции после пятого поколения мы зафиксировали резкое достоверное увеличение доли инфицированных особей с 52 % в пятом поколении до 78 % в шестом поколении ($p < 0,001$). В последующих поколениях, однако, мы не обнаружили достоверных изменений уровня инфицированности и к 11-му поколению это значение также, как и в шестом, составило 78 %. В 20-м поколении доля инфицированных мух составила 85 %, что соответствует теоретически предсказанным частотам инфицированности, а также это значение выше, чем в 11-м поколении, что соответствует теоретически предсказанному увеличению инфицированности.

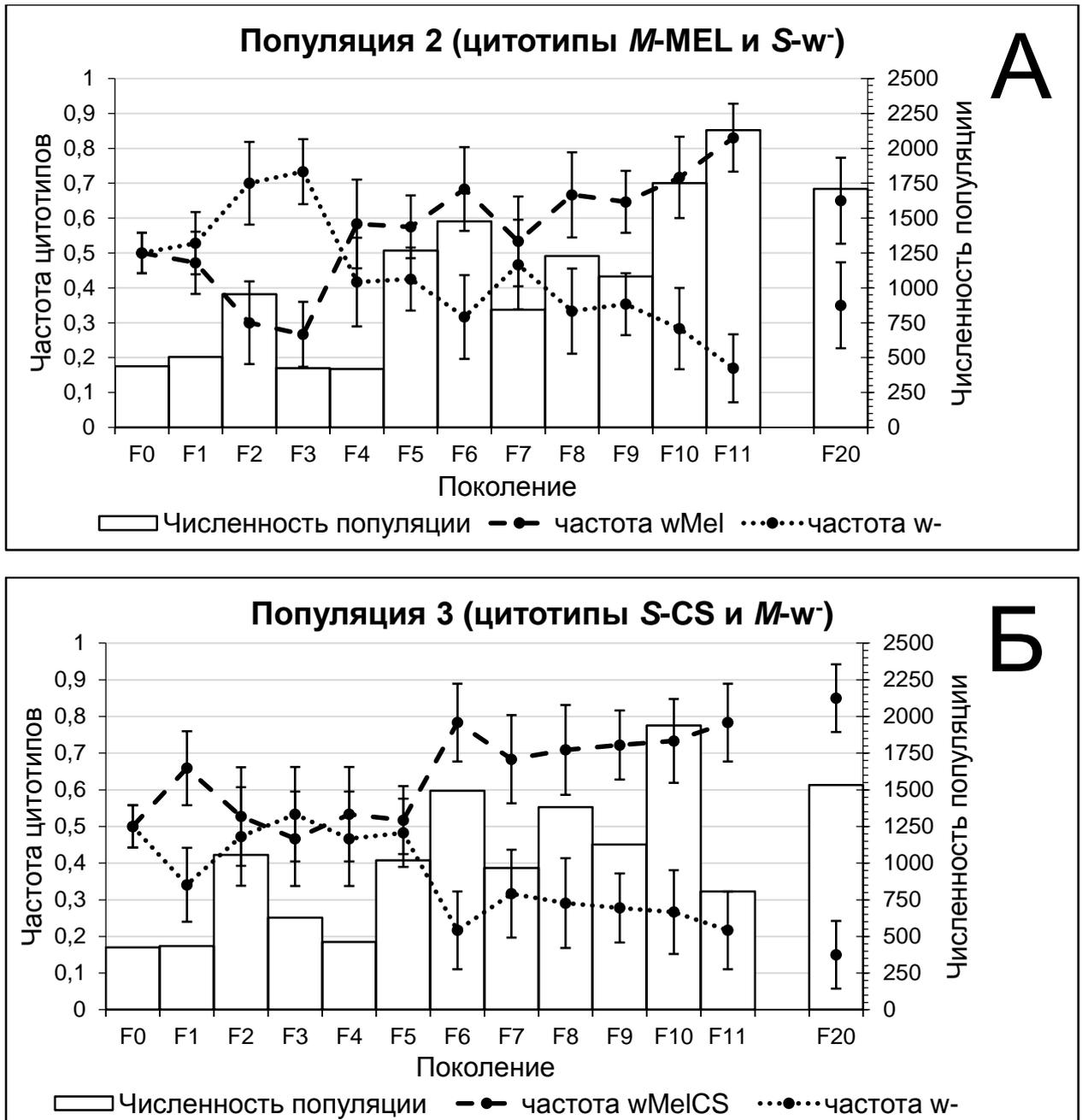


Рис. 3.8. Динамика изменения частот цитотипов *Drosophila melanogaster* на протяжении эксперимента во второй и третьей популяциях.

Исходя из анализа наблюдаемой динамики частот цитотипов мы предполагаем, что, во второй и третьей популяциях, также, как в первой и четвертой, произошедшие резкие изменения частот цитотипов могут быть обусловлены дрейфом генов. Поскольку достоверные изменения частот цитотипов произошли в обеих популяциях в одном-двух поколениях, на

протяжении оставшихся поколений достоверных изменений не наблюдалось, можно предположить, что *Wolbachia* в исследуемых экспериментальных популяциях не дает инфицированным особям какого-либо преимущества, по сравнению с неинфицированными. С другой стороны, нельзя исключать из рассмотрения влияние индуцируемой *Wolbachia* ЦН, которая могла проявляться во второй и третьей популяциях при скрещивании неинфицированных самок с инфицированными самцами.

На рис. 3.9 приведено сравнение экспериментальных значений с графиками, построенными на основании математической модели с учетом одинаковой плодовитости инфицированных и неинфицированных особей.

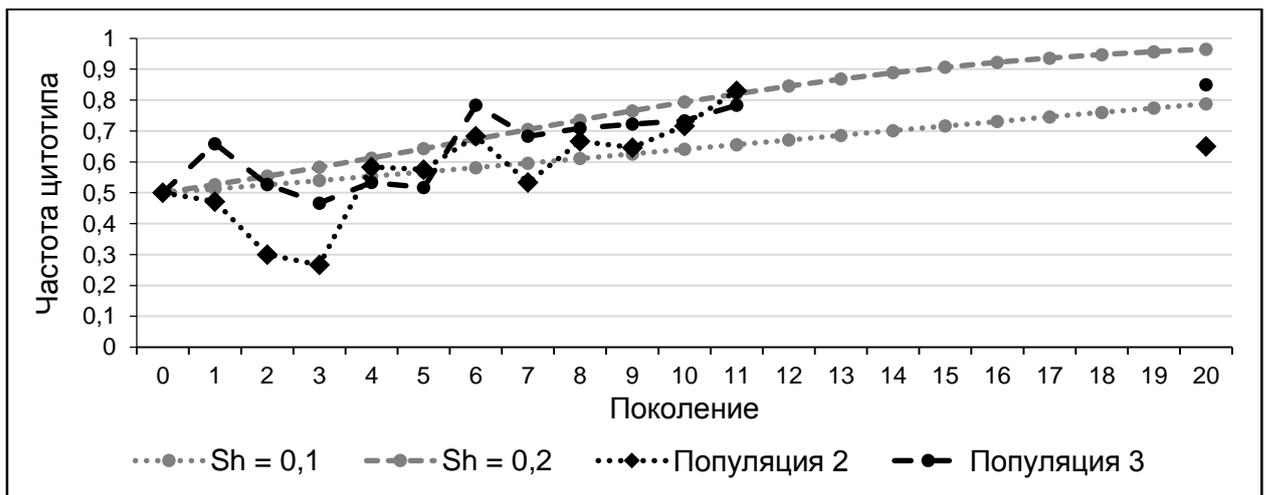


Рис. 3.9. Сравнение теоретической и наблюдаемой динамики цитотипов M-MEL и S-CS *D. melanogaster* во второй и третьей экспериментальных популяциях, соответственно, в течение 20 поколений при разных значениях уровня ЦН.

Очевидно, что часть полученных в эксперименте значений частот инфицированности для обеих популяций, не укладывается в промежуток между графиками, построенными на основании литературных данных о максимальном и минимальном уровнях ЦН в популяциях *D. melanogaster* (Hoffmann *et al.*, 1994; Илинский, 2008; Илинский, Захаров, 2009). Однако,

начиная с седьмого поколения в обеих популяциях полученные в эксперименте значения попадают в этот промежуток, а для третьей популяции и к 20-му поколению значение уровня инфицированности не выходит за предполагаемые границы. Вероятно, что наблюдаемые недостоверные изменения частот инфицированности на протяжении поколений с 7-го по 11-е могут быть результатом проявления ЦН. Исходя из рис. 3.9 значение уровня ЦН в исследуемых экспериментальных популяциях может находиться на уровне около 15 %.

Глава IV. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Распространенность симбиотической бактерии *Wolbachia* в природных популяциях *Drosophila melanogaster*

Эндосимбиотическая бактерия *Wolbachia* чрезвычайно широко распространена в природных популяциях *Drosophila melanogaster* по всему миру. Первые исследования распространенности *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster* различных регионов мира относятся к 1994 г. (Solignac *et al.*, 1994). Присутствие бактерии было обнаружено во всех исследованных регионах, и средний уровень инфицированности составил 40 %. Здесь следует подчеркнуть, что некоторые исследованные популяции отдельных регионов оказались свободными от *Wolbachia*. Для ряда случаев это можно объяснить недостаточным объемом выборок. В исследованиях последующих десятилетий для популяций *D. melanogaster* различных регионов было показано, что уровень инфицированности бактерией *Wolbachia* очень широко варьирует (рис. 4.1). Так, для одной из популяций *D. melanogaster* Африки, среди 101 проанализированного образца/линии только один образец показал наличие *Wolbachia* (Vespoor, Haddrill, 2011). В то же время, в популяциях *D. melanogaster* Австралии частота встречаемости *Wolbachia* достигала 100 % (Hoffmann *et al.*, 1994, 1998).



Рис. 4.1. Частоты инфицированности симбиотической бактерией *Wolbachia* природных популяций *Drosophila melanogaster* мира. Используются данные работ: Hoffmann *et al.* 1994, Solignac *et al.* (1994), Илинский, Захаров (2007а, б), Илинский (2008), Vespoor, Haddrill (2011), Richardson *et al.* (2012), а также собственные данные, полученные в ходе выполнения работы

В работах по изучению инфицированности евразийских природных популяций *D. melanogaster* бактерией *Wolbachia* было показано, во-первых, тотальная зараженность бактерией, а, во-вторых, частота инфицированности на уровне около 60 % (Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский 2008). Полученные в нашей работе результаты по частотам встречаемости *Wolbachia* в природных популяциях Евразии согласуются с ранее проведенными исследованиями, а также дополняют общую картину по распространенности *Wolbachia* в природных популяциях мира (рис. 4.1).

4.2 Разнообразие генотипов *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster* мира

На основании молекулярно-генетического анализа ДНК *Wolbachia* у *D. melanogaster* выделяется единственный штамм бактерии – wMel (Bourtzis *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1998; McGraw *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2002; Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2005). В дальнейшем, при анализе секвенированного генома *Wolbachia*, были выявлены пять полиморфных локусов, на основании которых штамм wMel был подразделен на пять генотипов (рис. 1.6) (Riegler *et al.*, 2005).

Данные различных исследований распространенности генотипов *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster* мира свидетельствуют о том, что преобладающим генотипом является wMel. Еще один генотип *Wolbachia* – wMelCS, встречается в разных регионах мира, однако его частота в природных популяциях крайне низкая (Riegler *et al.*, 2005; Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский 2008; Nunes *et al.*, 2008; Zakharov *et al.*, 2010; Ilinsky, 2013). В литературе описывается глобальное замещение генотипа *Wolbachia* wMelCS генотипом wMel, которое произошло в течение 80 лет

(Riegler *et al.*, 2005). Причины и механизмы этого процесса до сих пор остаются нераскрытыми.

Для природных популяций *D. melanogaster* Евразии имеются литературные данные по генотипическому разнообразию симбиотической бактерии *Wolbachia* за период с 1974 по 2007 гг. (Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский 2008; Zakharov *et al.*, 2010). В некоторых случаях в анализе использовалась только одна линия из региона. Таким образом, для некоторых регионов генотипическое разнообразие *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster* может быть охарактеризовано не полно.

В нашем исследовании представлены результаты скрининга природных популяций *D. melanogaster* Евразии за период с 2008 по 2013 гг., а объемы выборок составляют от 12 до 223 образцов, что дает возможность более полно охарактеризовать генотипический состав *Wolbachia*. Суммируя полученные нами и литературные данные, можно описать общую картину разнообразия генотипов бактерии в природных популяциях различных регионов Евразии. Так, в популяциях *D. melanogaster* Алтая и Узбекистана в нашем исследовании не зафиксировано присутствие *Wolbachia* генотипа wMelCS2, в то время как в предыдущих исследованиях отмечалась достаточно высокая частота этого генотипа: 28 % (7 линий из 25 исследованных) для популяций Алтая и 33 % (3 из 9) для Узбекистана. Для популяций *D. melanogaster* из Кабардино-Балкарии в предыдущем исследовании были проанализированы всего 4 линии (табл. 3.2). Все они оказались инфицированными *Wolbachia* генотипа wMel. В нашем исследовании общий объем выборки для данного региона составил 254 линии. В результате нам удалось зафиксировать два случая инфицированности линий бактерией генотипа wMelCS2, а частота *Wolbachia* генотипа wMel составила 65 % (164 линии из 254 исследованных) (Быков и др., 2014). Для природных популяций *D. melanogaster* Украины ранее был отмечен единичный случай инфицированности *Wolbachia* генотипа wMelCS2. Проведенный нами анализ

выборок из популяций этого региона выявил 4 случая инфицированности бактерией этого генотипа. Ранее в этом регионе был отмечен единичный случай присутствия *Wolbachia* генотипа wMelCS (Илинский и др., 2013). В нашем же исследовании ни одна линия из 223 проанализированных не была инфицирована *Wolbachia* этого генотипа. Это может быть объяснено крайне низкой частотой генотипа wMelCS в популяциях Украины. Описанный случай инфицированности относится к 1971 году. Нельзя исключать, что за прошедшее с тех пор время данный генотип *Wolbachia* мог элиминироваться из природных популяций этого региона.

Также в наш анализ вошла большая выборка из природных популяций *D. melanogaster* Швеции. В литературе только в одной работе есть данные по представленности генотипов *Wolbachia* в этом регионе, которые основываются на анализе 10 линий. Только 3 из них оказались инфицированы *Wolbachia*, при этом две линии несли бактерию wMel-генотипа, а для одной линии был определен wMel3-генотип симбионта (Riegler *et al.*, 2005). В нашей выборке из 57 линий для 50 было показано наличие *Wolbachia* генотипа wMel. Остальные линии были неинфицированы. Стоит отметить, что описанный факт обнаружения *Wolbachia* генотипа wMel3 является единственным в своем роде. Считается, что данный генотип бактерии мог появиться в результате длительного содержания линии в лаборатории, как результат дивергенции бактериального генома (Riegler *et al.*, 2005).

Помимо уже описанных генотипов *Wolbachia* в нашем исследовании в популяции с полуострова Синай нами был обнаружен новый генотип бактерии, обозначенный как wMel4. Частота этого нового генотипа в природных популяциях п-ова Синай, по нашим данным, составляет 29 %.

В ходе проведенного исследования, а также при анализе литературных данных, не было зафиксировано фактов инфицированности *D. melanogaster* в

популяциях Евразии бактерией *Wolbachia* генотипа wMel2 (Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский 2008; Zakharov *et al.*, 2010). Исходя из литературных данных, этот генотип бактерии распространен только в популяциях Юго-Восточной Азии, Индии и Японии (Riegler *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2008).

Суммируя наши и литературные данные в целом, можно утверждать, что из всех генотипов *Wolbachia* самым распространенным в природных популяциях *D. melanogaster* по всему миру является генотип wMel. До сих пор остается неизвестным, почему данный генотип настолько распространен в природе и каким образом произошло замещение *Wolbachia* wMelCS-генотипа бактерией генотипа wMel. Возможно, это связано с каким-либо мутуалистическим воздействием, либо с возможным влиянием факторов окружающей среды. На основании проведенного в данной работе эксперимента по изучению динамики распространения и поддержания разных генотипов *Wolbachia* в искусственно созданных лабораторных популяциях мы можем предположить, что на распространение и поддержание *Wolbachia* также влияет вызываемая бактерией цитоплазматическая несовместимость.

4.3 Разнообразие митотипов *D. melanogaster* в природных популяциях

В разных работах по анализу инфицированности природных популяций *D. melanogaster* симбиотической бактерией *Wolbachia* основное внимание уделяется именно факту инфицированности/неинфицированности и генотипическому составу *Wolbachia*. В то же время, исследований разнообразия митотипов *D. melanogaster* в природных популяциях среди неинфицированных особей не проводилось. Данные подобного исследования

могли бы дать представление о том, какой генотип *Wolbachia* чаще утрачивается в популяциях.

Обнаружение ассоциации митотипов *D. melanogaster* с генотипами *Wolbachia* (Ilinsky, Zakharov, 2006; Илинский, Захаров, 2007а, б) позволило провести анализ митотипического разнообразия *D. melanogaster* в природе (табл. 3.2). Наши результаты свидетельствуют о том, что преобладающим среди неинфицированных особей в природных популяциях *D. melanogaster* Евразии митотипом является *M*-митотип. Из 292 неинфицированных линий только 4 обнаружили *S*-митотип. Эти линии происходят из популяций Кабардино-Балкарии, в которых, при изучении генотипического разнообразия *Wolbachia*, были зафиксированы случаи инфицированности бактерией генотипа wMelCS2 (табл. 3.2). Этот генотип *Wolbachia* относится к CS-группе генотипов и ассоциирован с митотипами *S*-клады, так же, как и более распространенный генотип wMelCS (Ilinsky, 2013). Таким образом, можно предположить, что данные неинфицированные линии произошли от самок, инфицированных *Wolbachia* генотипа wMelCS2. Также можно предположить присутствие в природных популяциях *D. melanogaster* Кабардино-Балкарии *Wolbachia* генотипа wMelCS, который, в проведенных исследованиях генотипического разнообразия бактерии, еще не встречался (табл. 3.2).

Отсутствие неинфицированных особей с митотипом *S* в популяциях *D. melanogaster*, в которых ранее были обнаружены особи, инфицированные *Wolbachia* генотипа wMelCS или wMelCS2, может объясняться с одной стороны, низкой частотой данного генотипа бактерии в популяциях, а с другой – низким уровнем неполной материнской передачи. В первом случае, даже при потере симбионта в потомстве инфицированной самки, доля неинфицированных особей будет мала. Во втором случае, даже при высокой частоте встречаемости генотипа wMelCS в популяции, число

неинфицированных потомков будет очень низким. Также возможно и совместное действие этих двух факторов.

Митотипическое разнообразие можно рассматривать не только для инфицированных особей из популяций, но и для всей популяции в целом, опираясь на ассоциацию митотипов *D. melanogaster* с генотипами *Wolbachia* – цитотипы. С учетом статуса инфицированности и генотипа *Wolbachia*, выделяют четыре цитотипа *D. melanogaster*: *M-MEL*, *M-w*, *S-CS* и *S-w* (Ilnsky, 2013). Таким образом, если отдельно рассматривать распространенность митотипа *M* в природных популяциях *D. melanogaster*, то, с учетом частот цитотипов *M-MEL* и *M-w*, доля этого митотипа составит более 90 %. Соответственно, цитотип *S* будет встречаться в популяциях с частотами менее 10 %. По результатам данной работы, частота митотипа *S* в природных популяциях *D. melanogaster* Евразии с учетом инфицированных и неинфицированных особей составляет около 1 %, в то время, как доля митотипа *M* достигает 99 %.

4.4 Цитотипическое разнообразие лабораторных линий *Drosophila melanogaster*

Со времени первого обнаружения в середине 1960-х годов симбиотической бактерии *Wolbachia* у *D. melanogaster* (Wolstenholme, 1965) было проведено множество исследований по распространенности и генотипическому разнообразию этой бактерии, а также по ее влиянию на организм вида-хозяина (O'Neill, Karr, 1990; O'Neill *et al.*, 1992; Solignac *et al.*, 1994; Hoffmann *et al.*, 1994, 1998; Илинский, Захаров, 2007а, б; Verspoor, Haddrill, 2011; Richardson *et al.*, 2012; Ilnsky, 2013). Была обнаружена способность бактерии влиять на различные аспекты биологии *D. melanogaster*: репродуктивную систему (Fry *et al.*, 2004), продолжительность жизни (Fry *et*

al., 2004; Вайсман и др., 2009), проявление отдельных ядерных мутаций (Starr, Cline, 2002; Clark *et al.*, 2005; Ikeya *et al.*, 2009), а также определяет разнообразие мтДНК вида посредством непрямого отбора (Илинский, Захаров, 2007а; Nunes *et al.*, 2008; Richardson *et al.*, 2012; Plinsky, 2013). Существующее в природных популяциях *D. melanogaster* генотипическое разнообразие *Wolbachia* вызывает ряд вопросов. Каково генотипическое разнообразие *Wolbachia* в линиях лабораторных фондов? Имеется ли связь инфицированности с длительностью культивирования линии в лаборатории? Как связаны инфицированность и история происхождения линии? Влияют ли мутации на присутствие *Wolbachia* в цитоплазме *D. melanogaster*? Ответы на эти вопросы могут дать более четкое представление о биологии взаимоотношений симбионт-хозяин. Это особенно важно для работ, в которых не учитывался цитоплазматический фон линий *D. melanogaster*, что может привести к переосмыслению полученных ранее результатов. Это также поможет в будущем при планировании и постановке экспериментов с использованием лабораторных тестерных линий.

Из шести ранее описанных для природных популяций *D. melanogaster* генотипов *Wolbachia*, в мутантных линиях фонда лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН мы выявили присутствие трех генотипов: wMel, wMelCS и wMelCS2. Они относятся к четырем наиболее распространенным в природе генотипам бактерии. Нами не был обнаружен генотип wMel2, который широко распространен на территории Азии (Индия, Япония, Китай, Юго-Восточная Азия). Это связано в первую очередь с тем, что наиболее часто сборы материала сотрудниками лаборатории проводились на территории Восточной Европы, Средней Азии и Алтая. Так как в популяциях этих регионов были выявлены генотипы бактерии wMel, wMelCS и wMelCS2, то это объясняет наблюдаемое генотипическое разнообразие *Wolbachia* среди линий фонда. Также важную роль играет цитотип линий-основателей,

используемых при создании новых линий. Исходя из вышеперечисленных факторов, можно заключить, что представленность генотипов *Wolbachia* в фонде мутантных линий может качественно отражать генотипическое разнообразие бактерии на исследуемой территории. Однако количественное соотношение генотипов в целом по фонду слабо согласуется с наблюдаемыми в природных популяциях *D. melanogaster* частотами генотипов *Wolbachia* (Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский, 2008). В линиях фонда генотип *Wolbachia* wMel встречается менее чем у половины инфицированных линий, тогда как в природных популяциях все инфицированные мухи могут быть носителями бактерии этого генотипа. В то же время, доля редкого в природе генотипа wMelCS2 среди линий фонда составляет 47 % всех инфицированных линий.

В ряде публикаций описывается существование коэволюции мтДНК *D. melanogaster* и генотипов *Wolbachia*, что основано на материнском типе наследования митохондрий и бактерии (Plinsky, Zakharov, 2006; Илинский, Захаров, 2007а; Nunes *et al.*, 2008). Окончательно этот факт был установлен в последних работах (Richardson *et al.*, 2012; Plinsky, 2013). На основании исследований разнообразия мтДНК и данных филогенетического анализа установлено, что разделение митохондриальной наследственности на две главные клады *M* и *S* произошло в предковой популяции *D. melanogaster*, существовавшей около 14 тыс. лет назад в тропической Африке. В то же время произошло разделение *Wolbachia* на две ныне существующие группы генотипов.

В проведенном нами исследовании мутантных линий фонда было выявлено четыре цитотипа: *M*-MEL, *M*-w⁻, *S*-CS, *S*-w⁻ (табл. 3.4), а не 6 теоретически возможных. Это согласуется с результатами исследований природных популяций (Plinsky, 2013). Наиболее представленным цитотипом среди линий фонда является *S*-w⁻, обнаруженный у 40 % линий. Данный факт

объясняется тем, что большое число линий были созданы на основе линии 1-163, обладающей этим цитотипом. Мы не исключаем существование цитотипов *M-CS* и *S-MEL*. Обнаружение подобных сочетаний будет указывать на факт горизонтального переноса компонентов материнской наследственности. В основном, таким компонентом будет выступать *Wolbachia*.

В целом, определение митотипа совместно с генотипированием *Wolbachia* является надежным способом проверки происхождения линий, что особенно актуально ввиду широкого использования в лабораториях мира ограниченного числа линий *D. melanogaster* дикого типа. Например, две наиболее популярные лабораторные линии дикого типа, Canton-S и Oregon-R, использованные как основа для создания многих других линий, имеют цитотипы *S-CS* (*wMelCS*) и *S-w*, соответственно.

4.5 Динамика двух генотипов *Wolbachia* в экспериментальных популяциях *D. melanogaster*

В природных популяциях *Drosophila melanogaster* частота инфицированности симбиотической бактерией *Wolbachia* может зависеть от большого числа различных природных, генетических, физиологических а также случайных факторов. Лабораторные эксперименты позволяют создать контролируемые условия для проведения исследований. В нашем эксперименте мы исключили влияние, во-первых, возможных факторов, инициирующих мутуалистическое влияние *Wolbachia* на *D. melanogaster* (Starr, Cline, 2002; Harcombe, Hoffmann, 2004; Fry *et al.*, 2004 Clark *et al.*, 2005; Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008; Ikeya *et al.*, 2009; Вайсман и др., 2009), а, во-вторых, влияние генетического фона: использованные для постановки эксперимента линии имели выровненный ядерный фон. Все

экспериментальные популяции содержались при одинаковой температуре и снабжались одинаковым количеством корма. Поскольку из литературных данных для симбиотической системы *Wolbachia-D. melanogaster* в природе предполагается отсутствие влияния бактерии на плодовитость инфицированных самок (Hoffmann *et al.*, 1990, 1994; Fry *et al.*, 2004), а также показано, что уровень индуцируемой *Wolbachia* ЦН очень низок (Hoffmann *et al.*, 1994; Илинский, 2008; Илинский, Захаров, 2009), мы предполагали, что в экспериментальных популяциях либо частоты цитотипов будут поддерживаться на одном уровне, либо произойдет увеличение доли одного из цитотипов соответственно теоретическим данным, полученным на основании математической модели (рис. 3.2, 3.3).

Во всех четырех исследованных нами экспериментальных популяциях *D. melanogaster* наблюдаются изменения частот цитотипов на протяжении 11 неперекрывающихся поколений.

В контрольной популяции, где все мухи были неинфицированными и отличались только митотипом, увеличение доли особей с митотипом «М», по нашим предположениям, обусловлено влиянием генетического дрейфа. В двух независимых повторах неинфицированной популяции мы наблюдали схожую динамику цитотипов. В первом случае произошло резкое увеличение доли особей с митотипом «М» в первых двух поколениях и в дальнейшем это значение достоверно не изменялось, не произошло фиксации данного митотипа к 20-му поколению (рис. 3.4). Во втором случае достоверных изменений не происходило на протяжении пяти поколений содержания популяции (рис. 3.5). На основании данных результатов можно заключить, что митотип *D. melanogaster* не влияет на динамику цитотипов в экспериментальных популяциях и не дает какого-либо преимущества в приспособленности. Соответственно, в случае инфицированных популяций, изменения частот цитотипов могут быть обусловлены влиянием *Wolbachia*.

В популяциях, инфицированных *Wolbachia* только одного из двух исследуемых генотипов – wMel или wMelCS, к 11-му поколению доля особей, несущих бактерию, достигла 80 %. Полученная частота инфицированности в экспериментальных популяциях согласуется с данными по инфицированности *Wolbachia* природных популяций *D. melanogaster* (Solignac *et al.*, 1994; Hoffmann *et al.*, 1994, 1998; Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский 2008; Vesprool, Haddrill, 2011). Несмотря на это, мы не можем однозначно утверждать, что произошедшие изменения обусловлены исключительно влиянием бактерии. Увеличение уровня инфицированности в обеих популяциях произошло очень быстро – за одно поколение число инфицированных особей увеличилось на 30 % (рис. 3.8). Во второй популяции, где представлена *Wolbachia* генотипа wMel, изначально происходит снижение уровня инфицированности (рис. 3.8 А), несмотря на то, что данный генотип является самым распространенным в природных популяциях *D. melanogaster*. После резкого увеличения в четвертом поколении, частота инфицированности на протяжении последующих поколений достоверно не изменялась. Более того, в 20-м поколении уровень инфицированности снизился до значения, достигнутого в шестом поколении, т.е. ожидаемой на основании теоретических предположений фиксации частот мы не наблюдали. В третьей популяции, где представлена *Wolbachia* генотипа wMelCS, резкое увеличение доли инфицированных мух произошло в шестом поколении, однако, как в предыдущих, так и в последующих поколениях мы не наблюдали достоверных изменений частоты инфицированности (рис. 3.8 Б). Также к 20-му поколению не произошло увеличения частот инфицированности до значений, ожидаемых на основании теоретических кривых, а наоборот, наблюдалось снижение уровня инфицированности.

Мы предполагаем, что наблюдаемая в обеих популяциях динамика инфицированности обусловлена в большей степени случайными факторами.

Мы не исключаем существования ЦН в данных популяциях, так как для исходных линий были показаны факты проявления данной аномалии (Илинский, Захаров, 2009). Поскольку здесь присутствуют как инфицированные, так и неинфицированные особи, мы не могли исключить возможность несовместимых скрещиваний. По литературным данным выраженность данной репродуктивной аномалии в популяциях *D. melanogaster* слабая и находится в интервале от 10 до 20 % (Hoffmann *et al.*, 1994; Илинский, 2008; Илинский, Захаров, 2009). Была показана зависимость проявления ЦН от возраста самцов: чем моложе инфицированный самец, тем больший процент потомков от его скрещивания с неинфицированной самкой гибнет в результате несовместимости (Yamada *et al.*, 2007). В наших экспериментальных популяциях были представлены как молодые однодневные, так и более взрослые трех-четырёхдневные самцы, соответственно, точно определить, насколько сильно проявлялась ЦН, мы не можем. Исходя из сопоставления полученных экспериментальных данных с графиками, построенными на основании математической модели (рис. 3.2, 3.9), можно предположить, что если в исследованных экспериментальных популяциях проявлялась ЦН, то ее уровень должен составлять около 15 % или меньше, поскольку ожидаемой фиксации инфицированности к 20-му поколению не произошло.

В экспериментальной популяции, где представлены два генотипа *Wolbachia* – wMel и wMelCS, мы наблюдаем процесс вытеснения особей, инфицированных бактерией генотипа wMelCS, особями, инфицированными *Wolbachia* wMel-генотипа. Подобное явление в природных популяциях было ранее описано в литературе (Riegler *et al.*, 2005). За 60 лет распространенный в природных популяциях *D. melanogaster* генотип *Wolbachia* wMelCS был вытеснен генотипом wMel. Авторы указывают, что одновременно с заменой одного генотипа *Wolbachia* на другой происходило и распространение *P-*

элемента (Kidwell, 1983; Anholabehere *et al.*, 1988) и высказывают гипотезу, что эти события взаимосвязаны. В работе указывается, что распространение генотипа wMel началось из Америки в середине 20-го века совместно с *P*-элементом. Индуцируемая новым генотипом wMel ЦН, вкупе с гибридным дисгенезом, детерминируемым *P*-элементом, приводили к замещению цитотипов в популяциях. Однако наследование *Wolbachia* и *P*-элемента происходит независимо друг от друга, поэтому подобный механизм распространения бактерии не мог продолжаться длительно, а должен был затухнуть в течение нескольких поколений. Более того, показано, что генотип wMel и ассоциированные с ним митотипы в действительности не могут считаться новыми. В работах Ричардсона и Илинского показано, что генотип *Wolbachia* wMel возник в Африке задолго до распространения *Drosophila melanogaster* в мире (Richardson *et al.*, 2012; Ilinsky, 2013). Возможными факторами, обеспечивающими быстрое распространение wMel-генотипа *Wolbachia*, могут являться либо мутуалистическое влияние бактерии данного генотипа на хозяина, либо возможная двунаправленная цитоплазматическая несовместимость между генотипами *Wolbachia* wMel и wMelCS. Также можно предполагать, что *Wolbachia* генотипа wMelCS, наоборот, уменьшает плодовитость самок *D. melanogaster*, по сравнению с генотипом wMel, выступая в качестве “репродуктивного паразита”, однако в этом случае данный генотип должен был элиминироваться из природных популяций, чего, по результатам исследований, до настоящего времени не произошло. К 11-му поколению в экспериментальной популяции доля особей, несущих *Wolbachia* генотипа wMel увеличилась до 83 %, что согласуется с высокой частотой встречаемости этого генотипа в природных популяциях *D. melanogaster* (Riegler *et al.*, 2005; Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский 2008; Zakharov *et al.*, 2010; Ilinsky, 2013). Однако, также, как и в других исследованных экспериментальных популяциях, эти изменения произошли достаточно быстро. За два поколения доля особей с *Wolbachia* генотипа wMel увеличилась

с 53 до 77 % (рис. 3.6). Ни до, ни после этого мы не обнаружили достоверных изменений соотношения генотипов *Wolbachia* в популяции. К 20-му поколению, также, как и в других экспериментальных популяциях, не произошло фиксации частот генотипов бактерии, а доля особей с wMel-генотипом *Wolbachia* осталась на уровне 76 %. Поскольку полученные экспериментальные данные укладываются в теоретически предсказанные границы (рис. 3.7), можно было бы предположить, что самки *D. melanogaster*, несущие *Wolbachia* wMel-генотипа более плодовиты, чем самки с wMelCS-генотипом бактерии. Тогда возникает противоречие с данными из второй популяции, где изначально доля особей, инфицированных *Wolbachia* генотипа wMel снизилась, несмотря на возможное проявление ЦН. При большей плодовитости инфицированных самок, доля особей, несущих *Wolbachia* в этой популяции должна была увеличиваться на протяжении всего эксперимента, чего мы в ходе исследования не зафиксировали. Возможно, что между генотипами *Wolbachia* wMel и wMelCS существует ЦН, однако на основании проведенного эксперимента мы не можем однозначно это утверждать, а в литературе данное явление не проверялось. Таким образом, мы полагаем, что соотношение частот генотипов *Wolbachia* в первой популяции не изменилось за счет влияния бактерии, а произошедшее резкое увеличение доли инфицированных особей с *Wolbachia* генотипа wMel обусловлено действием генетического дрейфа.

На динамику инфицированности в экспериментальных популяциях *D. melanogaster* мог также влиять такой фактор, как неполная материнская передача *Wolbachia*, т.е. появление неинфицированных мух в потомстве инфицированной самки. По приведенным в литературе оценкам уровень неполной материнской передачи в популяциях *D. melanogaster* составляет 2 – 3 % (Hoffmann *et al.*, 1998). В ходе проведенного анализа выборок из поколений экспериментальных популяций мы не обнаружили фактов,

указывающих на потерю *Wolbachia*. Это может быть связано, с одной стороны, действительно с отсутствием в исследуемых популяциях неполной передачи бактерии, а с другой стороны, с недостаточным объемом взятых для анализа выборок, который не позволил зафиксировать факты утраты инфекции.

Таким образом, можно предположить, что на распространение *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster* влияют в большей степени условия среды и генетический фон хозяина, которые могут приводить к мутуалистическому взаимодействию бактерии с хозяином. Например, в одной из последних работ показано, что при низких температурах в популяции увеличивается доля особей, несущих *Wolbachia* генотипа wMel (Versace *et.al.*, 2014). В более ранних работах приводятся данные о том, что при экстремальных температурах *Wolbachia* генотипа wMel увеличивает продолжительность жизни инфицированных мух (Вайсман и др., 2009). Однако обнаруженные нами в ходе исследования факты возможного проявления ЦН на уровне 15 % нельзя исключать из рассмотрения, поскольку при данном значении репродуктивной аномалии бактерия может успешно распространяться в популяции и в отсутствие прочих факторов.

ВЫВОДЫ

1. Все исследованные популяции *Drosophila melanogaster* Евразии инфицированы эндосимбиотической бактерией *Wolbachia*: концентрация носителей бактерии варьирует от 33 % до 88 %.

2. Генотипическое разнообразие *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster* Евразии представлено генотипами wMel, wMelCS, wMelCS2 и wMel4. Наиболее распространенным генотипом является wMel – концентрация среди инфицированных особей 97 %. Генотипы *Wolbachia* wMelCS, wMelCS2 и wMel4 встречаются с частотами не более 1 %. В популяции *D. melanogaster* полуострова Синай обнаружен новый генотип *Wolbachia* – wMel4.

3. Для природных популяций *D. melanogaster* Евразии, среди свободных от *Wolbachia* дрозофил, установлено наличие митотипического разнообразия. Доминирующим митотипом, частота которого достигает 99 %, выступает ассоциированный с наиболее распространенным wMel-генотипом *Wolbachia* митотип «М», тогда как концентрация митотипа «S» не превышает 1 %.

4. В фонде лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН доля инфицированных *Wolbachia* линий *D. melanogaster* составляет 39 %. Бактерия представлена тремя генотипами: wMel, wMelCS и wMelCS2 с частотами 17, 4 и 18 %, соответственно. Митотипическое разнообразие среди лабораторных мутантных линий также представлено двумя митотипами с частотой 20 % для М-митотипа и 40 % – для S-митотипа. Средние частоты цитотипов среди линий фонда сильно отличаются от частот цитотипов в природе. Также

частоты цитотипов отличаются и внутри отдельных групп мутантных линий. Наблюдаемые отличия объясняются историей ведения линий в лаборатории.

5. Для экспериментальных популяций *Drosophila melanogaster* прослежена динамика изменений частот цитотипов. Показано, во-первых, отсутствие влияния митотипа *D. melanogaster* на динамику цитотипов; во-вторых, сохранение *Wolbachia* в ряду 20 поколений размножения хозяина во всех инфицированных популяциях; в-третьих, увеличение в течение 20 поколений доли особей, несущих *Wolbachia*, для популяций, инфицированных бактерией генотипов wMel и wMelCS, с первоначально заданных 50 % до 83 и 78 %, соответственно; в-четвертых, вытеснение особями, несущими wMel-генотип особей, несущих wMelCS-генотип *Wolbachia*. Наблюдаемые конечные частоты генотипов в экспериментальных популяциях, а также соотношение разных генотипов, сопоставимы с частотами инфицированности и соотношениями генотипов в природе.

6. Предполагается, что наблюдаемые изменения частот цитотипов в экспериментальных популяциях *D. melanogaster* обусловлены влиянием генетического дрейфа и ЦН. Индуцированная *Wolbachia* цитоплазматическая несовместимость в экспериментальных популяциях *D. melanogaster*, по приблизительным оценкам, может достигать уровня 15 %. Показано, что самки *D. melanogaster*, инфицированные *Wolbachia* генотипа wMel, имеют такую же плодовитость, что и самки, инфицированные бактерией wMelCS-генотипа. На основании анализа полученных данных есть основания полагать, что бактерия не оказывает существенного влияния на репродуктивную функцию *D. melanogaster* в экспериментальных популяциях.

Список используемой литературы

1. Астауров Б. Л. Искусственный партеногенез у тутового шелкопряда (Экспериментальное исследование). ☐ М. – Л.: Изд-во АН СССР, 1940.-240с.
2. Астауров Б. Л. Партеногенез, андрогенез и полиплоидия. ☐ М.: Наука, 1977.-343с.
3. Быков Р. А., Илинский Ю. Ю., Волошина М. А., Захаров И. К. Распространенность и генотипическое разнообразие симбиотической бактерии *Wolbachia* в популяции *Drosophila melanogaster* г. Нальчик. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. Т. 18. № 2. – С. 315-318.
4. Вайсман Н. Я., Илинский Ю. Ю., Голубовский М. Д. Популяционно-генетический анализ продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*: сходные эффекты эндосимбионта *Wolbachia* и опухолевого супрессора Igl в условиях температурного стресса // Журнал общей биологии. ☐ 2009. Т. 70. № 5. ☐ С. 425-434.
5. Воронцов Н. Н. Развитие эволюционных идей в биологии. ☐ М.: Издат.отдел УНЦ ДО МГУ, Прогресс-Традиция, АБФ, 1999.-640с.
6. Дудкина Н. В., Воронин Д. А., Киселева Е. В. Структурная организация и распределение симбиотических бактерий *Wolbachia* в ранних эмбрионах и яичниках *Drosophila melanogaster* и *D. simulans* // Цитология. ☐ 2004. Т. 46. №3. ☐ С. 208-220.
7. Захаров И. А., Шайкевич Е. В., Горячева И. И. Бактерии рода *Spirioplasm* инфицируют двуточечную божью коровку (*Adalia bipunctata* L.) в России. // Доклады Академии наук. ☐ 1998. Т. 362. № 4. ☐ С. 570.

8. Захаров И. А., Горячева И. И., Шайкевич Е. В., Х. Граф фон дер Шуленбург, Межерес М. Э. Н. *Wolbachia* – новая бактерия, вызывающая сдвиг в соотношении полов у двуточечной божьей коровки *Adalia bipunctata* L. // Генетика. – 2000. Т.36. №4 – С. 482.
9. Захаров И. А., Марков А. В. Внутриклеточный паразит *Wolbachia* и происхождение эвкариот // Успехи современной биологии. ☐ 2005. Т. 125. №4. ☐ С. 323-336.
10. Илинский Ю. Ю., Захаров И. К. Характеристика инфицированности цитоплазматическим эндосимбионтом *Wolbachia* популяции *Drosophila melanogaster* Умани // Доклады Академии наук. ☐ 2007а. Т. 413. №4. ☐ С. 561-563.
11. Илинский Ю. Ю., Захаров И. К. Эндосимбионт *Wolbachia* в евразийских популяциях *Drosophila melanogaster* // Генетика. ☐ 2007б. Т. 43. №7. ☐ С. 905-915.
12. Илинский Ю. Ю. Эндосимбионт *Wolbachia* в природных популяциях *Drosophila melanogaster* Северной Евразии // Дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск. 2008. – 154с.
13. Илинский Ю. Ю., Захаров И. К. Цитоплазматическая несовместимость у *Drosophila melanogaster*, обусловленная различными генотипами *Wolbachia* // Экологическая генетика. ☐ 2009. Т. 7. №2. ☐ С. 11-18.
14. Илинский Ю. Ю., Быков Р. А., Захаров И. К. Цитотипы мутантных линий *Drosophila melanogaster* фонда лаборатории гентики популяций ИЦиГ СО РАН: генотипы эндосимбионта *Wolbachia* и митотипы вида-хозяина. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. Т. 17. №3. – С. 404-423.

15. Лус Я. Я. Некоторые закономерности размножения популяций *Adalia bipunktata* L. Бессамцовые линии в популяциях. // Доклады Академии Наук СССР. ☐ 1947. Т.57. №9. ☐ С. 951-954.
16. Маргелис Л. Роль симбиоза в эволюции клетки. ☐ М.: Мир, 1983. ☐352с.
17. Мережковский К. С. Теория двух плазм как основа симбиогенезиса, нового учения о происхождении организмов. – Казань, 1909. ☐ 102с.
18. Фаминцын А. С. О роли симбиоза в эволюции организмов // Зап. Императ. Акад. наук, физ-мат. отд. Сер. VIII. ☐ 1907. Т.20. №3. ☐ С. 1-14.
19. Ahantarig A., Trinachartvanit W., Kittayapong P. Relative *Wolbachia* density of field-collected *Aedes albopictus* mosquitoes in Thailand // J. of Vector Ecology. ☐ 2008. ☐ V. 33. No. 1. ☐ P. 173-177.
20. Anbutsu H., Fukatsu T. Population Dynamics of Male-Killing and Non-Male-Killing Spiroplasmas in *Drosophila melanogaster* // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. - Vol. 69. N. 3. ☐ P. 1428-1434.
21. Anxolabehere D., Kidwell M.G., Periquet G. Molecular characteristics of diverse populations are consistent with the hypothesis of a recent invasion of *Drosophila melanogaster* by mobile P elements // Mol. Biol. Evol. – 1988. – Vol. 5. – P. 252-269.
22. Arakaki N., Miyoshi T., Noda H. *Wolbachia*-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Franklinothrips vespiformis* (Thysanoptera: Insecta) // Proc. Biol. Sci. ☐ 2001. ☐ Vol. 268. ☐ P. 1011-1016.
23. Augustinos A. A., Santos-Garcia D., Dionyssopoulou E., Moreira M., Papapanagiotou A., Scarvelakis M., Doudoumis V., Ramos S., Aguiar A. F., Borges

P. A., Khadem M., Latorre A., Tsiamis G., Bourtzis K. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of aphids: is the hidden diversity fully unraveled? // PLoS One. 2011. Vol. 6, N. 12. e28695.

24. Azzouna A., Greve P., Martin G. Sexual differentiation traits in functional males with female genital apertures (#fga) in the woodlice *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda, Crustacea) // General and Comparative Endocrinology. 2004. Vol. 138. – P. 42-49.

25. Baldo, L., J. H. Werren. Revisiting *Wolbachia* supergroup typing based on wsp: spurious lineages and discordance with MLST // Curr. Microbiol. 2007. Vol. 55. P. 81-87.

26. Baldo, L., L. Prendidi, A. Corthals, J. H. Werren. *Wolbachia* are present in Southern African scorpions and cluster with supergroup F // Curr. Microbiol. 2007. Vol. 55. P. 367-373.

27. Ballard J.W., Kreitman M. Unraveling selection in the mitochondrial genome of *Drosophila* // Genetics. 1994. Vol. 138. P. 757-772.

28. Bandi C., Anderson T. J., Genchi C., Blaxter M. L. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes // Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1998. Vol. 265. P. 2407-2413.

29. Bian G., Joshi D., Dong Y., Lu P., Zhou G., Pan X., Xu Y., Dimopoulos G., Xi Z. *Wolbachia* Invades *Anopheles stephensi* Populations and Induces Refractoriness to Plasmodium Infection // Science. – 2013. – Vol. 340. – P. 748.

30. Boiler E. F., Bush G. L. Evidence for genetic variation in populations of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae) based on physiological parameters and hybridization experiments // Entomol. Exp. Appl. – 1974. – Vol. 17. – P. 279-293.

31. Boiler E. F., Russ K., Vallo V., *et al.* Incompatible races of European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae) their origin and potential use in biological control // Entomol. Exp. Appl. – 1976. – Vol. 20. – P. 237-247.
32. Bonnefoy E., Orsi G. A., Couble P., Loppin B. The essential role of Drosophila HIRA for de novo assembly of paternal chromatin at fertilization // PLoS. Genet. – 2007. – Vol. 3. – P. 1991–2006.
33. Bordenstein S. R., Rosengaus R. B. Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in Isoptera // Curr. Microbiol. – 2005. – Vol. 51. – P. 393-398.
34. Bouchon D., Rigaud T., Juchault P. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization // Proc. R. Soc. Lond. B. – 1998. – Vol. 265. – P. 1081-1090.
35. Bourtzis K. *Wolbachia*-based technologies for insects pest population control // Aksoy S. Transgenesis and the management of vector-borne disease. – Advances in Experimental Medicine and Biology, 2008. – Vol. 627. – P. 104-113.
36. Bourtzis K., Nirgianaki A., Onyango P., Savakis C. A prokaryotic dnaA sequence in *Drosophila melanogaster*: *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility among laboratory strains // Insect Mol. Biol. – 1994. – Vol. 3. – P. 131-142.
37. Boyle L., O'Neill S. L., Robertson H. M *et al.* Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila* // Science. – 1993. – Vol. 260. – P. 1796-1799.
38. Braig H. R., Guzman H., Tesh R. B. *et al.* Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart // Nature. – 1994. – Vol. 367. – P. 453-455.

39. Braig H. R., Zhou W., Dobson S. L., O'Neill S. L. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis* // J. Bacteriol. – 1998. – Vol. 180. – P. 2373-2378.
40. Breeuwer J. A., Werren J. H. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species // Nature. – 1990. – Vol. 346. – P. 558-560.
41. Breeuwer J.A., Stouthamer R., Barns S.M., Pelletier D.A., Weisburg W.G., Werren J.H. Phylogeny of cytoplasmic incompatibility micro-organisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences // Insect Mol. Biol. – 1992. – Vol. 1. – P. 25-36.
42. Breeuwer J.A., Werren J.H. Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis* // Genetics. – 1993. – Vol. 135. – P. 565-574.
43. Breeuwer J.A. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the spider mites *Tetranychus urticae* and *T. turkestanii* // Nature. – 1997. – Vol. 79. – P. 41-47.
44. Bressac C., Rousset F. The reproductive incompatibility system in *Drosophila simulans*: Dapi-staining analysis of the *Wolbachia* symbionts in sperm cysts // J. Invertebr. Pathol. – 1993. – Vol. 61. – P. 226-230.
45. Callaini G., Dallai R., Riparbelli M.G. *Wolbachia*-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans* // J. Cell Sci. – 1997. – Vol. 110. – P. 271-280.
46. Casiraghi, M., S. R. Bordenstein, L. Baldo, N. Lo, T. Beninati, J. J. Wernegreen, J. H. Werren, C. Bandi. Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode

symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree // *Microbiology*. – 2005. – Vol. 151. – P. 4015-4022.

47. Charlat S., Calmet C., Mercot H. On the mod resc model and the evolution of *Wolbachia* compatibility types // *Genetics*. – 2001. – Vol. 159. – P. 1415-1422.

48. Charlat S., Nirgianaki A., Bourtzis K., *et al.* Evolution of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* and *D. sechellia* // *Evolution*. – 2002. – Vol. 56. – P. 1735-1742.

49. Charlat S., Le Chat L., Mercot H. Characterization of non-cytoplasmic incompatibility inducing *Wolbachia* in two continental African populations of *Drosophila simulans* // *Heredity*. – 2003. – Vol. 90. – P. 49-55.

50. Cheng Q., Ruel T. D., Zhou W., Moloo S. K., Majiwa P., O'Neill S.L., Aksoy S. Tissue distribution and prevalence of *Wolbachia* infections in tsetse flies, *Glossina* spp. // *Med. Vet. Entomol.* – 2000. – Vol. 14. – P. 44-50.

51. Clancy D. J., Hoffmann A. A. Behavior of *Wolbachia* endosymbionts from *Drosophila simulans* in *Drosophila serrata*, a novel host // *Am. Nat.* – 1997. – Vol. 149. – P. 975-988.

52. Clark M. E., Veneti Z., Bourtzis K., Karr T. L. The distribution and proliferation of the intracellular bacteria *Wolbachia* during spermatogenesis in *Drosophila* // *Mech. Dev.* – 2002. – Vol. 111. – P. 3-15.

53. Clark M.E., Anderson C.L., Cande J., Karr T.L. Widespread prevalence of *Wolbachia* in laboratory stocks and the implications for *Drosophila* research // *Genetics*. – 2005. – Vol. 170. – P. 1667-1675.

54. Covacin, C., S. C. Barker. Supergroup F *Wolbachia* bacteria parasitise lise (Insecta: Phthiraptera) // *Parasitol. Res.* – 2007. – Vol. 100. – P. 479-485.

55. De Barro P. J., Hart P. J. Antibiotic curing of parthenogenesis in *Eretmocerus mundus* (Australian parthenogenic form) // *Entomologia Experimentalis et Applicata*. – 2001. – Vol. 99. – P. 225–230.
56. Dean M. D., Ballard K. J., Glass A., Ballard J. W. Influence of two *Wolbachia* strains on population structure of East African *Drosophila simulans* // *Genetics*. – 2003. – Vol. 165. – P. 1959–1969.
57. Dean M. D. A *Wolbachia*-associated fitness benefit depends on genetic background in *Drosophila simulans* // *Proc. R. Soc. B*. – 2006. – Vol. 273. – P. 1415–1420.
58. Dedeine F., Vavre F., Fleury F., Loppin B., Hochberg M. E., Bouletreau M. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp // *PNAS*. – 2001. – Vol. 98. N. 11. – P. 6247–6252.
59. Dobson S. L., Marsland E. J., Rattanadechakul W. Mutualistic *Wolbachia* Infection in *Aedes albopictus*: Accelerating Cytoplasmic Drive // *Genetics*. – 2002. – Vol. 160. – P. 1087–1094.
60. Dong P., Jin-Jun Wang, Fei Hu, Fu-Xian Jia. Influence of *Wolbachia* Infection on the Fitness of the Stored-Product Pest *Liposcelis tricolor* (Psocoptera: Liposcelididae) // *Journal of Economic Entomology*. – 2007. – Vol. 100. N. 4. – P. 1476–1481.
61. Dyer K. A., Minhas M. S., Jaenike J. Expression and modulation of embryonic male-killing in *Drosophila innubila*: opportunities for multilevel selection // *Evolution*. – 2005. – Vol. 59. N. 4. – P. 838–848.
62. Faria V. G., Sucena E. *Wolbachia* in the Malpighian Tubules: Evolutionary Dead-End or Adaptation? // *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)*. – 2013. – Vol. 320B. – P. 195–199.

63. Fenn K., Blaxter M. Are filarial nematode *Wolbachia* obligate mutualist symbionts? // Trends Ecol. Evol. – 2004. – Vol. 19. – P. 163-166.
64. Fenn K., Blaxter M. *Wolbachia* genomes: Revealing the biology of parasitism and mutualism // Trends Parasitol. – 2006. – Vol. 22. – P. 60-65.
65. Foster, J., Ganatra, M., Kamal, I., Ware, J., Makarova, K., Ivanova, N., Bhattacharyya, A., Kapatral, V., Kumar, S., Posfai, J., Vincze, T., Ingram, J., Moran, L., Lapidus, A., Omelchenko, M., Kyrpides, N., Ghedin, E., Wang, S., Goltsman, E., Joukov, V., Ostrovskaya, O., Tsukerman, K., Mazur, M., Comb, D., Koonin, E., Slatko, B. The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode // Plos Biol. – 2005. – Vol. 3. – P. 599-614.
66. Fry A. J., Palmer M. R., Rand D. M. Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster* // Heredity. – 2004. – Vol. 93. – P. 379-389.
67. Giordano R, O'Neill S. L., Robertson H. M. *Wolbachia* infections and the expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila sechellia* and *D. mauritiana* // Genetics. – 1995. – Vol. 140. – P. 1307-1317.
68. Guillemand T., Pasteur N., Rousset F. Contrasting levels of variability between cytoplasmic genomes and incompatibility types in the mosquito *Culex pipiens*. // Proc. R. Soc. Lond. Ser. Biol. Sci. – 1997. – Vol. 264. – P. 245-251.
69. Haegeman A., Vanholme B., Jacob J., Vandekerckhove T. T. M., Claeys M., Borgonie G., Gheysen G. An endosymbiotic bacterium in a plant-parasitic nematode: Member of a new *Wolbachia* supergroup // Int. J. Parasitol. – 2009. – Vol. 39. N. 9. – P. 1045-1054.
70. Harcombe W., Hoffmann A. A. *Wolbachia* effects in *Drosophila melanogaster*: in search of fitness benefits // Journal of Invertebrate Pathology. – 2004. – Vol. 87. – P. 45-50.

71. Haselkorn T. S., Markow T. A., Moran N. A. Multiple introductions of the Spiroplasma bacterial endosymbiont into *Drosophila* // *Molecular Ecology*. – 2009. – Vol. 18. – P. 1294–1305.
72. Hedges L. M., Brownlie J. C., O’Neill S. L., Johnson K. N. *Wolbachia* and Virus Protection in Insects // *Science*. – 2008. – Vol. 322. – P.702.
73. Hertig M., Wolbach S. Studies on rickettsia-like microorganisma in insects // *J. Med. Res.* – 1924. – Vol. 44. – P. 329-374.
74. Hertig M. The rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et. sp. n.) and associated inclusions of the mosquito *Culex pipiens* // *Parasitology*. – 1936. – Vol. 28. – P. 453-486.
75. 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. – Vol. 281. – P. 215-220.
76. Hoerauf A., Nissen-Pahle K., Schmetz C., Henkle-Duhrsen K., Blaxter M. L., *et al.* Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility // *J. Clin. Invest.* – 1999. – Vol. 103. – P. 11-18.
77. Hoerauf A., Volkmann L., Hamelmann C., Adjei O., Autenrieth I.B., *et al.* Endosymbiotic bacteria in worms as targets for a novel chemo-therapy in filariasis // *Lancet*. – 2000. – Vol. 355. – P. 1242–1243.
78. Hoffmann, A. A., M. Turelli, G. M. Simmons. Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans* // *Evolution*. – 1986. – Vol. 40. – P. 692–701.

79. Hoffmann A. A., Turelli M. Unidirectional incompatibility in *Drosophila simulans*: Inheritance, geographic variation and fitness effects // *Genetics*. – 1988. – Vol. 119. – P. 435-444.
80. Hoffmann A. A., Turelli M., Harshman L. G. Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* // *Genetics*. – 1990. – Vol. 126. – P. 933-948.
81. Hoffmann A. A., Clancy D. J., Merton E. Cytoplasmic incompatibility in Australian populations of *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. – 1994. – Vol. 136. – P. 993-999.
82. Hoffmann A. A., Clancy D., Duncan J. Naturally-occurring *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility // *Heredity*. – 1996. – Vol. 76. – P. 1-8.
83. Hoffmann, A. A., M. Hercus, H. Dagher. Population Dynamics of the *Wolbachia* Infection Causing Cytoplasmic Incompatibility in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. – 1998. – Vol. 148. – P. 221-231.
84. Hosokawa T., Ryuichi Koga, Yoshitomo Kikuchi, Xian-Ying Meng, Takema Fukatsu. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist // *PNAS*. – 2010. – Vol. 107. N. 2. – P. 769–774.
85. Hsiao P., Hsiao C. Rickettsia as the cause of cytoplasmic incompatibility in the alfalfa weevil, *Hypera postica* // *J. Invertebr. Pathol.* – 1985. – Vol. 45. – P. 244-246.
86. Hurst L. D. The evolution of cytoplasmic incompatibility or when spite can be successful // *J. Theor. Biol.* – 1991. – Vol. 148. – P. 269-277.

87. Hurst G. D. D., Majerus M. E. N., Walker L. E. Cytoplasmic male killing elements in *Adalia bipunctata* (Linnaeus) (Coleoptera: Coccinellidae) // *Heredity*. – 1992. – Vol. 59. – P. 84-91.
88. Hurst G. D., Johnson A. P., Schulenburg J. H., Fuyama Y. Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: A temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density // *Genetics*. – 2000. – Vol. 156. – P. 699-709.
89. Ikeya T., Broughton S., Alic N., Grandison R., Partridge L. The endosymbiont *Wolbachia* increases insulin/IGF-like signalling in *Drosophila* // *Proc. R. Soc. B*. – 2009. – Vol. 206. – P. 3799-3807.
90. Ilinsky Y. Coevolution of *Drosophila melanogaster* mtDNA and *Wolbachia* Genotypes // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. N. 1. – e54373.
91. Ilinsky, Yu.Yu., I.K. Zakharov. Genetic correlation between types of mtDNA of *Drosophila melanogaster* and genotypes of its primary endosymbiont, *Wolbachia* // *Drosoph. Inf. Serv.* – 2006. – Vol. 89. – P.89–91.
92. Iturbe-Ormaetxe I., Burke G. R., Riegler M., O'Neill S. L. Distribution, expression, and motif variability of ankyrin domain genes in *Wolbachia pipientis* // *J. Bacteriol.* – 2005. – Vol. 187. – P. 5136-5145.
93. Jaenike J, Unckless R, Cockburn S. N., Boelio L. M., Perlman S. J. Adaptation via Symbiosis: Recent Spread of a *Drosophila* Defensive Symbiont // *Science*. – 2010. – Vol. 329. – P. 212.
94. James A. C., Ballard J. W. Expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* and its impact on infection frequencies and distribution of *Wolbachia pipientis* // *Evolution Internat. J. Org. Evolution*. – 2000. – Vol. 54. – P. 1661-1672.

95. James, A. C., M. D. Dean, M. E. McMahon, J. W. O. Ballard. Dynamics of double and single *Wolbachia* infections in *Drosophila simulans* from New Caledonia // *Heredity*. – 2002. – Vol. 88. – P. 182–189.
96. Jamnongluk W., Kittayapong P., Baisley K. J., O'Neill S. L. *Wolbachia* infection and expression of cytoplasmic incompatibility in *Armigeres subalbatus* (Diptera: Culicidae) // *J. Med. Entomol.* – 2000. – Vol. 37. – P. 53-57.
97. Jeyaprakash A., Hoy M. A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species // *Insect Molecular Biology*. – 2000. – Vol. 9. N. 4. – P. 393–405.
98. Jiggins F. M., Hurst G. D. D., Majerus M. E. N. Sex ratio distortion in *Acrae encedon* (Lepidoptera: Nymphalidae) is caused by a male-killing bacterium // *Heredity*. – 1998. – Vol. 81. – P. 87-91.
99. Kageyama D., Nishimura G., Hoshizaki S., Ishikawa Y. Feminizing *Wolbachia* in an insect, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae) // *Heredity*. – 2002. – Vol. 88. – P. 444–449.
100. Kambhampati S., Rai K. S., Verleye D. M. Frequencies of mitochondrial DNA haplotypes in laboratory cage populations of the mosquito, *Aedes albopictus* // *Genetics*. – 1992. – Vol. 132. – P. 205-209.
101. Kang L., Zhu H., Cheng Q., Zhou W., Sun L., Cai L., Ma X., Chen C., Zhao S., Li C. Cloning and characterization of a gene encoding glutathione-regulated potassium-efflux system protein kefkl from the endosymbiont *Wolbachia* // *DNA Seq.* – 2002. – Vol. 13. – P. 375-381.
102. Kidwell M.G. Evolution of hybrid dysgenesis determinants in *Drosophila melanogaster* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1983. – Vol. 80. – P. 1655-1659.

103. Kose H., Karr T. L. Organization of *Wolbachia pipientis* in the *Drosophila* fertilized egg and embryo revealed by an anti-*Wolbachia* monoclonal antibody // *Mech. Dev.* – 1995. – Vol. 51. – P. 275-288.
104. Kremer N, Voronin D, Charif D, Mavingui P, Mollereau B, et al. *Wolbachia* Interferes with Ferritin Expression and Iron Metabolism in Insects // *PLoS Pathog.* – 2009. – Vol. 5. N. 10. – e1000630.
105. Landmann F, Orsi G. A, Loppin B, Sullivan W. *Wolbachia*-Mediated Cytoplasmic Incompatibility Is Associated with Impaired Histone Deposition in the Male Pronucleus // *PLoS Pathog.* – 2009. – Vol. 5. N. 3. – e1000343.
106. Lo N., Casiraghi M., Salati E., Bazzocchi C., Bandi C. How many *Wolbachia* supergroups exist? // *Mol. Biol. Evol.* – 2002. – Vol. 19. – P. 341-346.
107. Loppin B, Bonnefoy E, Anselme C, Laurencon A, Karr T. L, Couble P. The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus // *Nature.* – 2005. Vol. 437. – P. 1386–1390.
108. Margulis L. Symbiogenesis. A new principle of evolution rediscovery of Boris Mikhaylovich Kozo-Polyansky (1890-1957) // Труды международной научной конференции “Чарльз Дарвин и современная биология (21-23 сентября 2009 г., Санкт-Петербург)”. – Нестор-история: Санкт-Петербург, 2010. – С. 34-48.
109. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms // *Journal of Molecular Biology.* – 1961. – Vol. 3. – P. 208-218.
110. Marcad I. I., Souty-Grosset C., Bouchon D., Rigaud T., Raimond R. Mitochondrial DNA variability and *Wolbachia* infection in two sibling woodlice species // *Heredity.* – 1999. – Vol. 83. – P. 71-78.

111. McGraw E. A., Merritt D. J., Droller J. N., O'Neill S. L. Wolbachia-mediated sperm modification is dependent on the host genotype in *Drosophila* // Proc. Biol. Sci. – 2001. – Vol. 268. – P. 2565-2570.
112. McGraw E. A., Merritt D. J., Droller J. N *et al.* Wolbachia density and virulence attenuation after transfer into a novel host // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol. 99. – P. 2918-2923.
113. Mercot H., Llorente B., Jacques M., Atlan A., Montchamp-Moreau C. Variability within the Seychelles cytoplasmic incompatibility system in *Drosophila simulans* // Genetics. – 1995. – Vol. 141. – P. 1015-1023.
114. Mercot H., Charlat S. Wolbachia infections in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: Polymorphism and levels of cytoplasmic incompatibility // Genetica. – 2004. – Vol. 120. – P. 51-59.
115. Mercot H., Poinot D. Infection by *Wolbachia*: from passengers to residents // C. R. Biologies. – 2009. – Vol. 332. – P. 284–297.
116. Miller W. J., Ehrman L., Schneider D. Infectious Speciation Revisited: Impact of Symbiont-Depletion on Female Fitness and Mating Behavior of *Drosophila paulistorum* // PLoS Pathog. – 2010. – Vol. 6. N. 12. – e1001214.
117. Min K. T., Benzer S. *Wolbachia*, normally symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and death // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – Vol. 94. – P. 10792-10796.
118. Montchamp-Moreau C., Ferveur J. F., Jacques M. Geographic distribution and inheritance of three cytoplasmic incompatibility types in *Drosophila simulans* // Genetics. – 1991. – Vol. 129. – P. 399-407.

119. Montenegro H., Solferini V. N., Klaczko L. B., Hurst G. D. D. Male-killing *Spiroplasma* naturally infecting *Drosophila melanogaster* // *Insect Molecular Biology*. – 2005. – Vol. 14. N. 3. – P. 281-287.
120. Montenegro H., Petherwick A. S., Hurst G. D. D., Klaczko L. B. Fitness effects of *Wolbachia* and *Spiroplasma* in *Drosophila melanogaster* // *Genetica*. – 2006. – Vol. 127. – P. 207-215.
121. Negri I., Pellecchia M., Mazzoglio P. J., Patetta A., Alma A. Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/X0 sex-determination system // *Proc. R. Soc. B*. – 2006. – Vol. 273. – P. 2409-2416.
122. Nigro L. The effect of heteroplasmy on cytoplasmic incompatibility in transplasmic lines of *Drosophila simulans* showing a complete replacement of the mitochondrial DNA // *Heredity*. – 1991. – Vol. 66 (Pt 1). – P. 41-45.
123. Nunes M. D. S., Nolte V., Schlotterer C. Nonrandom *Wolbachia* Infection Status of *Drosophila melanogaster* Strains with Different mtDNA Haplotypes // *Mol. Biol. Evol.* – 2008. – Vol. 25. N. 11. – P. 2493–2498.
124. O'Neill, S. L., T. L. Karr. Bi-directional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans* // *Nature*. – 1990. – Vol. 348. – P. 178-180.
125. O'Neill S. L., Giordano R., Colbert A. M., Karr T. L., Robertson H. M. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1992. – Vol. 89. – P. 2699-2702.
126. Osaka R, Nomura M, Watada M, Kageyama D. Negative Effects of Low Temperatures on the Vertical Transmission and Infection Density of a *Spiroplasma* Endosymbiont in *Drosophila hydei* // *Curr. Microbiol.* – 2008. – Vol. 57. – P. 335–339.

127. Osborne S. E., Leong Y. S., O'Neill S. L., Johnson K. N. Variation in Antiviral Protection Mediated by Different *Wolbachia* Strains in *Drosophila simulans* // PLoS Pathog. – 2009. – Vol. 5. N. 11. – P. 1-9.
128. Panaram, K. J. L. Marshall. F supergroup *Wolbachia* in bush crickets: what do patterns of sequence variation reveal about this supergroup and horizontal transfer between nematodes and arthropods? // Genetica. – 2007. – Vol. 130. – P. 53-60.
129. Perrot-Minnot M. J., Guo L. R., Werren J. H. Single and double infections with *Wolbachia* in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*: Effects on compatibility // Genetics. – 1996. – Vol. 143. – P. 961-972.
130. Pidiyar V. J., Jangid K., Dayananda K. M., Kaznowski A., Gonzalez J. M., Patole M. S., Shouche Y. S. Phylogenetic affiliation of *Aeromonas culicicola* MTCC 3249(t) based on *gyrB* gene sequence and pcr-amplicon sequence analysis of cytolytic enterotoxin gene // Syst. Appl. Microbiol. – 2003. – Vol. 26. – P. 197-202.
131. Poinot D., Bourtzis K., Markakis G., Savakis C., Mercot H. *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: Host effect and cytoplasmic incompatibility relationships // Genetics. – 1998. – Vol. 150. – P. 227-237.
132. Poinot D., Charlat S., Mercot H. On the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility: Confronting the models with the facts // Bioessays. – 2003. – Vol. 25. – P. 259-265.
133. Pool J. E., Wong A., Aquadro C. F. Finding of male-killing *Spiroplasma* infecting *Drosophila melanogaster* in Africa implies transatlantic migration of this endosymbiont // Heredity. – 2006. – Vol. 97. – P. 27-32.

134. Raimond R., Marcade I., Bouchon D., Rigaud T., Bossy J. P., Souty-Grosset C. Organization of the large mitochondrial genome in the Isopod *Armadillidium vulgare* // Genetics. – 1999. – Vol. 151. – P. 203-210.
135. Rao R. U, Moussa H., Weil G.J. *Brugia malayi*: Effects of antibacterial agents on larval viability and development in vitro // Exp. Parasitol. – 2002. – Vol. 101. – P. 77–81.
136. Rajan T. V. Relationship of anti-microbial activity of tetracyclines to their ability to block the L3 to L4 molt of the human filarial parasite *Brugia malayi* // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 2004. – Vol. 71. – P. 24–28.
137. 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. – Vol. 8. N. 12. – e1003129.
138. Riegler M., Charlat S., Stauffer C., et al. *Wolbachia* transfer from *Rhagoletis cerasi* to *Drosophila simulans*: Investigating the outcomes of host-symbiont coevolution // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70. – P. 273-279.
139. Riegler M., Sidhu M., Miller W. J., O'Neill S. L. Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster* // Curr. Biol. – 2005. – Vol. 15. – P.1428-1433.
140. Rigaud T., Souty-Grosset C., Raimond R., Mocquard J., Juchault P. Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda): recent acquisitions // Endocytobiosis Cell Res. – 1991. – Vol. 7. – P. 259-273.
141. Rigaud T., Bouchon D., Souty-Grosset C., Raimond R. Mitochondrial DNA polymorphism, sex ratio distorters and population genetics in the Isopod *Armadillidium vulgare* // Genetics. – 1999. – V. 152. – P. 1669-1677.

142. Robinson A. S, Hooper G, eds. Fruit Flies, Their Biology, Natural Enemies and Control // World Crop Pests 3B – Amsterdam: Elsevier, 1989.
143. Rokas A., Atkinson R.J., Brown G.S., West S.A., Stone G.N. Understanding patterns of genetic diversity in the oak gallwasp *Biorhiza pallida*: Demographic history or a *Wolbachia* selective sweep? // Heredity. – 2001. – Vol. 87. – P. 294-304.
144. Ros V. I., Fleming V. M., Feil E. J., Breeuwer J. A. How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae) // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – Vol. 75. N. 4. – P. 1036-104.
145. Rousset F., Solignac M. Evolution of single and double *Wolbachia* symbioses during speciation in the *Drosophila simulans* complex // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – Vol. 92. – P. 6389-6393.
146. Rousset F., Braig H. R., O'Neill S. L. A stable triple *Wolbachia* infection in *Drosophila* with nearly additive incompatibility effects // Heredity. – 1999. – Vol. 82. – P. 620-627.
147. Rowley, S. M., R. J. Raven, E. A. McGraw. *Wolbachia pipientis* in Australian spiders // Curr. Microbiol. – 2004. – Vol. 48. – P. 469-475.
148. Royou A., McCusker D., Kellogg D. R., Sullivan W. Grapes(Chk1) prevents nuclear CDK1 activation by delaying cyclin B nuclear accumulation // J. Cell Biol. – 2008. – Vol. 183. – P. 63-75.
149. Sakamoto J. M., J. Feinstein, J. L. Rasgon. *Wolbachia* infections in the Cimicidae: museum specimens as an untapped resource for endosymbiont surveys // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 72. – P. 3161-3167.

150. Saridaki A., Bourtzis K. *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals // *Current Opinion in Microbiology*. – 2010. – Vol. 13. – P. 67-72.
151. Sasaki T., Ishikawa H. Transfection of *Wolbachia* in the Mediterranean flour moth, *Ephesia kuehniella*, by embryonic microinjection // *Heredity*. – 2000. – Vol. 85. – P. 130-135.
152. Schneider D., W. J. Miller, M. Riegler. Arthropods Shopping for *Wolbachia* // Zchori-Fein E., Bourtzis K. Manipulative tenants. Bacteria associated with arthropods – Boca Raton. CRC Press. – 2012. – P. 149-174.
153. Schoenmaker A., Vandenbosch F., Stouthamer R. Symbiotic bacteria in parasitoid populations-coexistence of *Wolbachia*-infected and uninfected *Trichogramma* // *Oikos*. – 1998. – Vol. 81. – P. 587-597.
154. Serbus L. R., Casper-Lindley C., Landmann F., Sullivan W. The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions // *Annu. Rev. Genet.* – 2008. Vol. 42. – P. 683-707.
155. Serbus L. R., Landmann F., Bray W. M., White P. M., Ruybal J., *et al.* A Cell-Based Screen Reveals that the Albendazole Metabolite, Albendazole Sulfone, Targets *Wolbachia* // *PLoS Pathog.* – 2012. – Vol. 8. N. 9. – e1002922.
156. Shoemaker D. D., Katju V., Jaenike J. *Wolbachia* and the evolution of reproductive isolation between *Drosophila recens* and *Drosophila subquinaria* // *Evolution*. – 1999. – Vol. 53. – P. 1157-1164.
157. Shoemaker D. D., Keller G., Ross K. G. Effects of *Wolbachia* on mtDNA variation in two fire ant species // *Mol Ecol.* – 2003. – Vol. 12. – P. 1757-1771.
158. Shoemaker D. D., Dyer K. A., Ahrens M., McAbee K., Jaenike J. Decreased diversity but increased substitution rate in host mtDNA as a consequence

of *Wolbachia* endosymbiont infection // *Genetics*. – 2004. – Vol. 168. – P. 2049-2058.

159. Sinkins S. P., O'Neill S. L. *Wolbachia* as a vehicle to modify insect populations // Handler A., James A., eds. *Insect Transgenesis* – Boca Raton. CRC Press. – 2000. – P. 271-287.

160. Slatko B. E., Taylor M. J., Foster J. M. The *Wolbachia* endosymbiont as an anti-filarial nematode target // *Symbiosis*. – 2010. – Vol. 51. – P. 55–65.

161. Solignac M., Monnerot M. Race formation, speciation, and introgression within *Drosophila simulans*, *D. mauritana*, and *D. sechellia* inferred from mitochondrial DNA analysis // *Evolution*. – 1986. – Vol. 40. N. 3. – P. 531-539.

162. 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. – Vol. 317. – P. 461-470.

163. Starr D. J., Cline T. W. A host parasite interaction rescues *Drosophila* oogenesis defects // *Nature*. – 2002. – Vol. 418. – P. 76-79.

164. Stouthamer R., Werren J. H. Microorganisms associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma* // *J. Invertebrate Pathol.* – 1993. – Vol. 61. – P. 6-9.

165. Strunov A., Kiseleva E., Gottlieb Y. Spatial and temporal distribution of pathogenic *Wolbachia* strain wMelPop in *Drosophila melanogaster* central nervous system under different temperature conditions // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2013. – Vol. 114. – P. 22–30.

166. Sun L.V., Foster J.M., Tzertzinis G., Ono M., Bandi C., Slatko B. E., O'Neill S. L. Determination of *Wolbachia* genome size by pulsed-field gel electrophoresis // *J. Bacteriol.* – 2001. – Vol. 183. – P. 2219-2225.
167. Taylor M. J., Bandi C., Hoerauf A. M., Lazdins J. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes: A target for control? // *Parasitol. Today* – 2000a. – Vol. 16. – P. 179-180.
168. Taylor M. J., Cross H. F., Bilo K. Inflammatory responses induced by the filarial nematode *Brugia malayi* are mediated by lipopolysaccharide-like activity from endosymbiotic *Wolbachia* bacteria // *J. Exp. Med.* – 2000b. – Vol. 191. – P. 1429–1436.
169. Timmermans M. J. T. N., J. Marien, D. Roelofs, N. M. van Straalen, J. Ellers. Evidence for multiple origins of *Wolbachia* infection in springtails // *Pedobiologia.* – 2004. – Vol. 48. – P. 469-475.
170. Teixeira L., Ferreira A., Ashburner M. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster* // *PLoS Biol.* – 2008. Vol. 6. N. 12. – P. 2753-2763.
171. Turelli M., Hoffmann A. A. Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila* // *Nature.* – 1991. – Vol. 353. – P. 440-442.
172. Turelli M., Hoffmann A. A., McKechnie S. W. Dynamics of cytoplasmic incompatibility and mtDNA variation in natural *Drosophila simulans* populations // *Genetics.* – 1992. – Vol. 132. – P. 713-723.
173. Turelli M. Evolution of incompatibility-inducing microbes and their hosts. // *Evolution.* – 1994. – Vol. 48. – P. 1500-1513.

174. Turelli M., Hoffmann A. A. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: Dynamics and parameter estimates from natural populations // *Genetics*. – 1995. – Vol. 140. – P. 1319-1338.
175. Vandekerckhove T. T. N., S. Watteyne, A. Willems, J. G. Swing, J. Mertens, M. Gillis. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its implications for wolbachial taxonomy // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1999. – Vol. 180. – P. 279-286.
176. Veneti Z., Toda M. J., Hurst G. D. D. Host resistance does not explain variation in incidence of male-killing bacteria in *Drosophila bifasciata* // *BMC Evolutionary Biology*. – 2004. – Vol. 4 – P. 52.
177. Versace E., Nolte V., Pandey R.V., Tobler R., Schlotterer C. Experimental evolution reveals habitat-specific fitness dynamics among *Wolbachia* clades in *Drosophila melanogaster* // *Mol. Ecol.* – 2014. – Vol. 23. – P. 802-814.
178. 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. – Vol. 6. N. 10. – e26318.
179. Watts T., Haselkorn T. S., Moran N. A., Markow T. A. Variable Incidence of Spiroplasma Infections in Natural Populations of *Drosophila* Species // *PLoS ONE*. – 2009. – Vol. 4. N. 5. – e5703.
180. Weeks A. R., Turelli M., Harcombe W. R., Reynolds K. T., Hoffmann A. A. From parasite to mutualist: Rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila* // *PLoS Biol.* – (2007). – Vol. 5. N. 5 – e114.
181. Werren J. H., G. D Hurst, W. Zhang, J. A. Breeuwer, R. Stouthamer, M. E. Majerus. Rickettsial relative associated with male killing in the ladybird beetle (*Adalia bipunctata*) // *J. Bacteriol.* – 1994. – Vol. 176. N. 2. – P. 388.

182. Werren J. H., D. Windsor, L. R. Guo. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods // Proc. R. Soc. Lond. B. – 1995a. – Vol. 262. – P. 197-204.
183. Werren J. H., W. Zhang, L. R. Guo. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods // Proc. R. Soc. London. B. – 1995b. – Vol. 261. P. 55-71.
184. Werren J. H. Biology of *Wolbachia* // Annu. Rev. Entomol. – 1997a. – Vol. 42. – P. 587-609.
185. Werren J. H. *Wolbachia* run amok // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997b. – Vol. 94. N. 21. – P. 11154-11155.
186. Werren J. H., Baldo L., Clark M. E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology // Nat Rev Microbiol. – 2008. – Vol. 6. N. 10. – P. 741-751.
187. Wolstenholme D.R. A DNA and RNA-containing cytoplasmic body in *Drosophila melanogaster* and its relation to flies // Genetics. – 1965. – Vol. 52. – P. 949-975.
188. Xi Z., Khoo C. C. H., Dobson S. L. *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population // Science. – 2005. – Vol. 310. – P. 326-328.
189. Xie J., Vilchez I., Mateos M. Spiroplasma Bacteria Enhance Survival of *Drosophila hydei* Attacked by the Parasitic Wasp *Leptopilina heterotoma* // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5. N. 8. – e12149.
190. Yamada R., Floate K. D., Riegler M., O'Neill S. L. Male development time influences the strength of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility expression in *Drosophila melanogaster* // Genetics. – 2007. – Vol. 177. – P. 801-808.

191. Yen J. H., Barr A. R. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* // Nature. – 1971. – Vol. 232. – P. 657-658.
192. Yen J. H., Barr A. R. The Etiological Agent of Cytoplasmic Incompatibility in *Culex pipiens* // Journal of invertebrate pathology. – 1973. – Vol. 22. – P. 242-250.
193. Zabalou S., Charlat S., Nirgianaki A., et al. Natural *Wolbachia* infections in the *Drosophila yakuba* species complex do not induce cytoplasmic incompatibility but fully rescue the wRi modification // Genetics. – 2004a. – Vol. 167. – P. 827-834.
194. Zabalou S., Riegler M., Theodorakopoulou M., et al. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004b. – Vol. 101. – P. 15042-15045.
195. Zabalou S., Apostolaki A., Pattas S., Veneti Z., Paraskevopoulos C., Livadaras I., Markakis G., Brissac T., Mercot H., Bourtzis K. Multiple Rescue Factors Within a *Wolbachia* Strain // Genetics. – 2008. – Vol. 178. – P. 2145-2160.
196. Zakharov I. K., Ilinsky Yu.Yu., Vaulin O.V., Sinyansky Ya.Ya., Bocherikov A.M., Koromyslov Y.A., Ivannikov A.V., Voloshina M.A., Zakharenko L.P., Kovalenko L.V., Cheresiz S.V., Yurchenko N.N. Dynamic processes shaping the gene pools in the natural populations of *Drosophila melanogaster* // Труды международной научной конференции “Чарльз Дарвин и современная биология (21-23 сентября 2009 г., Санкт-Петербург)”. – Нестор-история: Санкт-Петербург, 2010. С. 159-169.
197. Zchori-Fein E., O. Faktor, M. Zeidan, Y. Gottlieb, H. Czosnek, D. Rosen. Parthenogenesis-inducing microorganisms in *Aphytis* Hymenoptera: (Aphelinidae) // Insect Molecular Biology. – 1995. – Vol. 4. – P. 173–178.

198. Zchori-Fein E., R. T. Roush, D. Rosen. Distribution of parthenogenesis-inducing symbionts in ovaries and eggs of *Aphytis* (Hymenoptera: Aphelinidae) // *Current Microbiology*. – 1998. – Vol. 36. – P. 1–8.
199. Zheng Y., Ren P-P., Wang J-L., Wang Y-F. Wolbachia-Induced Cytoplasmic Incompatibility Is Associated with Decreased Hira Expression in Male *Drosophila* // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6. N. 4 – e19512.
200. Zhou W., Rousset F., O'Neil S. Phylogeny and pcr-based classification of Wolbachia strains using wsp gene sequences // *Proc. Biol. Sci.* – 1998. – Vol. 265. – P. 509-515.
201. 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. – Vol. 7. N. 6. – e38544.