

На правах рукописи

Быков Роман Андреевич

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

(03.02.07) «генетика»

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск 2014

Работа выполнена в Лаборатории генетики популяций Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор,
Захаров Илья Кузьмич

Официальные оппоненты: **Бугров Александр Геннадьевич**
доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории филогении и фауногенеза, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Похолкова Галина Витальевна
доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва.

Защита диссертации состоится «__» _____ 201__ года на утреннем заседании диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 003.011.01 в Институте цитологии и генетики СО РАН в конференц-зале Института по адресу:
проспект Академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090.
Тел. (383) 3634906, факс (383)3331278, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: www.bionet.nsc.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 201__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т. М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение симбиотических взаимоотношений представляет огромный научный интерес для многих разделов биологии – от молекулярной биологии до эволюции. Например, появление лишайников явилось следствием симбиоза грибов и водорослей. На основании этого была предложена теория симбиогенеза, которая подразумевает симбиогенетическое происхождение клеток зеленых растений (Фаминцын, 1907; Мережковский, 1909; Воронцов, 1999). В настоящее время общепризнано положение о том, что митохондрии, фотосинтезирующие пластиды и даже ядро эукариотических клеток возникли в результате симбиоза с бактериями (Маргелис, 1983; Margulis, 2010).

Бактерия *Wolbachia* является широко распространенным эндосимбионтом членистоногих и некоторых видов нематод. Эта бактерия передается строго вертикально по материнской линии и способна индуцировать у вида-хозяина различные репродуктивные аномалии, направленные на увеличение доли самок в популяции.

Одним из видов-хозяев *Wolbachia* является *Drosophila melanogaster* – популярный модельный объект биологических исследований. Природные популяции *D. melanogaster* по всему миру инфицированы *Wolbachia*, а частоты инфицированности популяций варьируют от 1 до 100 % (Solignac *et al.*, 1994; Hoffmann *et al.*, 1994, 1998; Илинский, Захаров, 2007; Илинский, 2008; Vespoor, Haddrill, 2011). У *D. melanogaster* на основании подробного анализа генома единственного штамма *Wolbachia* wMel в настоящее время выделяют 6 различных генотипов бактерии: wMel, wMelCS, wMelCS2, wMel2, wMel3 и wMel4 (Riegler *et al.*, 2005, Ilnsky, 2013). Установлено, что наиболее распространенным генотипом *Wolbachia* в природе является wMel, а остальные либо редко встречаются в популяциях, либо характерны только для определенных регионов (Riegler *et al.*, 2005; Илинский, Захаров, 2007; Nunes *et al.*, 2008). Влияние *Wolbachia* на репродукцию *D. melanogaster* заключается в индукции цитоплазматической несовместимости (ЦН), при которой потомство от скрещивания неинфицированной самки с инфицированным самцом частично или полностью гибнет на ранних стадиях эмбрионального развития. В природных популяциях *D. melanogaster* уровень ЦН либо очень низкий, либо отсутствует (Hoffmann *et al.*, 1998). Таким образом, невозможно объяснить столь широкое распространение бактерии только за счет ЦН. Исследования мутуалистического влияния *Wolbachia* на *D. melanogaster* также не выявили факторов, которые могли бы дать окончательный ответ на этот вопрос (Starr, Cline, 2002; Fry *et al.*, 2004; Harcombe, Hoffmann, 2004; Clark *et al.*, 2005; Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008; Ikeya *et al.*, 2009; Вайсман и др., 2009). Также остаются неизвестными причины преобладания в природных популяциях *D. melanogaster* бактерии *Wolbachia* генотипа wMel. Было показано, что данный генотип бактерии за несколько лет вытеснил ранее распространенный

генотип wMelCS (Riegler *et al.*, 2005), но механизм этого процесса до сих пор неизвестен.

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 и практическая значимость работы. В ходе работы был проведен анализ инфицированности бактерией *Wolbachia* природных популяций *Drosophila melanogaster* различных регионов за 2008-2013 гг. Был 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 мутантных 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.

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*. Определение митотипа совместно с генотипированием *Wolbachia* может стать надежным способом проверки происхождения лабораторных 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*.

Положения, выносимые на защиту:

1. Генотипическое разнообразие *Wolbachia* в природных популяциях *Drosophila melanogaster* Евразии представлено 4 генотипами со значительным преобладанием генотипа wMel – 97 %.
2. Разнообразие гаплотипов мтДНК *D. melanogaster* в природных популяциях Евразии представлено двумя кладами с преобладанием M-клады – 99 %.
3. Плодовитость инфицированных бактерией *Wolbachia* особей *D. melanogaster* не зависит от генотипа бактерии.
4. Генетический дрейф и цитоплазматическая несовместимость являются факторами, обеспечивающими изменения частот генотипов *Wolbachia* в экспериментальных популяциях *D. melanogaster*.

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.

Объем и структура диссертации. 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 наименований.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 работ, из них 3 статьи в журналах, входящих в список ВАК.

Личный вклад автора. Результаты эксперимента по изучению динамики цитотипов *D. melanogaster* в экспериментальных популяциях и основная часть данных по инфицированности природных популяций *D. melanogaster*, разнообразию генотипов *Wolbachia* и мтДНК *D. melanogaster* получены автором самостоятельно. Разработка схемы эксперимента и анализ цитотипического разнообразия линий *D. melanogaster* фонда лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН проведены совместно с Ю.Ю. Илинским (ИЦиГ СО РАН).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сборы из природных популяций

Для анализа распространенности эндосимбионта *Wolbachia* в природных популяциях *Drosophila melanogaster* были использованы изосамочьи линии, полученные от оплодотворенных в природе самок из популяций 8 регионов Евразии за период с 2008 по 2013 гг. (табл. 1). Всего было создано и проанализировано 836 изосамочьих линий *D. melanogaster*.

Из мух каждой линии выделяли ДНК, методом ПЦР определялся статус инфицированности линии и митотип (гаплотип митохондриальной ДНК) *D. melanogaster*. Для *Wolbachia*-положительных образцов проводилось определение генотипа бактерии.

Коллекция лабораторных линий *Drosophila melanogaster*

Для изучения распространенности и генотипического разнообразия *Wolbachia* среди лабораторных линий была использована коллекция мутантных линий *D. 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).

Выделение ДНК

Выделение ДНК проводилось по стандартной методике с модификациями (Marmur, 1961). В пробирку, объемом 1,5 мл, помещались несколько самок *Drosophila melanogaster* и добавлялось 200 мкл экстрагирующего буфера (10 mM Трис-НСl (рН 8.0), 25 mM ЭДТА, 0,5 % SDS, 0,1 M NaCl). 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.

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*: двум локусам встройки инсерционной последовательности IS5, двум минисателлитным повторам VNTR и инверсии в локусе WD0394-WD0541.

Для определения митотипа *D. 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. 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.

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 - 4 В/см.

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

Для эксперимента по анализу динамики инфицированности экспериментальных популяций *D. melanogaster* были выбраны 4 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). 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) ♀ Bi90 × ♂ w153, (2) ♀ w153 × ♂ Bi90, (3) ♀ Bi90T × ♂ w153T и (4) ♀ w153T × ♂ Bi90T.

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 при 16°C не более 3 суток. В дальнейшем они были использованы для создания четырех экспериментальных ящичных популяций, контрастных по цитоплазматическому фону.

Каждая популяция изначально состояла из 300 самок и 200 самцов (150 самок и 100 самцов от линии-основательницы). В первом ящике половина особей была инфицирована *Wolbachia* генотипа wMel, а вторая половина – wMelCS. Во втором и третьем ящиках половина особей была неинфицирована, а другая половина инфицирована *Wolbachia* генотипа wMel или wMelCS соответственно. Неинфицированные особи отличались от инфицированных по митотипу, что позволяло отследить возможную утрату бактерии. В четвертом ящике все особи были неинфицированными и отличались между собой только митотипом: одна половина имела митотип *M*, а другая – *S*. Данная популяция использовалась в качестве контрольной без влияния *Wolbachia*.

В каждый популяционный ящик с периодичностью в 2-3 дня в течение недели помещалось по 15 пробирок со свежим стандартным кормом. Мухи откладывали яйца при постоянной температуре 25°C. Эксперимент продолжался в течение 20 поколений, при этом первые 11 поколений не перекрывались между собой. Сбор мух из популяционных ящичков осуществлялся при помощи энтомологического эксгаустера, особи разделялись по полу, подсчитывались, фиксировались в 96 % этиловом спирте и помещались на хранение при -20°C.

Для анализа инфицированности *D. melanogaster* бактерией *Wolbachia* методом ПЦР брались выборки, объемом не менее 60 самок. Для первого, второго и третьего популяционных ящичков в случае, если особь оказывалась неинфицированной, проводился анализ митотипа в целях, во-первых, установить пригодность выделенной ДНК для анализа и, во-вторых, для выявления особей, утративших бактерию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Инфицированность природных популяций *D. melanogaster* Евразии симбиотической бактерией *Wolbachia*

Из 836 проанализированных изосамочьих линий *D. melanogaster* для 540 был установлен положительный статус инфицированности симбиотической бактерией *Wolbachia*, что составляет 65 % (табл. 1). Ни в одной из исследованных популяций не было обнаружено полного отсутствия бактерии. Согласно данным более ранних исследований, частота встречаемости *Wolbachia* в евразийских природных популяциях *D. melanogaster* находится на уровне около 60 % (Илинский, Захаров, 2007а, б; Илинский 2008). В целом, для природных популяций *D. melanogaster* мира средний уровень инфицированности *Wolbachia* оценивается на уровне около 45 % (Solignac *et al.*, 1994; Hoffmann *et al.*, 1994, 1998; Vesprool, Haddrill, 2011). Таким образом, результаты проведенного исследования согласуются с данными, полученными другими исследователями, и дополняют общую картину распространенности *Wolbachia* в популяциях *D. melanogaster*.

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. 1). В популяции с Алтая нами была обнаружена *Wolbachia* генотипа wMelCS. Этот генотип бактерии также был обнаружен в популяциях Узбекистана.

В более ранних исследованиях для популяций *D. melanogaster* Алтая и Узбекистана отмечены случаи инфицированности мух *Wolbachia* генотипа wMelCS2 (Илинский, Захаров, 2007; Илинский, 2008), однако в ходе проведенного исследования этот генотип бактерии не был обнаружен.

В четырех линиях из популяции *D. melanogaster* Украины и в двух линиях из популяции Кабардино-Балкарии, была обнаружена *Wolbachia* генотипа wMelCS2. Если ранее в популяциях Украины отмечалось наличие данного генотипа, то для Кабардино-Балкарии присутствие *Wolbachia* генотипа wMelCS2 показано впервые. Также, в популяции с полуострова Синай в ходе исследования был обнаружен новый, ранее не описанный генотип *Wolbachia*, обозначенный как wMel4 (Ilinsky, 2013).

В целом, суммируя наши и литературные данные, можно утверждать, что из всех генотипов *Wolbachia* самым распространенным в природных популяциях *D. melanogaster* по всему миру является генотип wMel. Также в мире распространен генотип *Wolbachia* wMelCS, однако, частота его встречаемости в популяциях крайне низкая. Остальные описанные генотипы *Wolbachia* встречаются в природных популяциях *D. melanogaster* только отдельных регионов.

Таблица 1. Инфицированность природных популяций *D. melanogaster* Евразии бактерией *Wolbachia*.

Регион, год сбора	Число линий	Инфицировано, генотип <i>Wolbachia</i>				Неинфицировано, митотип	
		wMel	wMelCS	wMelCS2	wMel4	<i>M</i>	<i>S</i>
Западная Сибирь (Новосибирск), 2008	57	38	0	0	0	19	0
Западная Сибирь (Томск), 2011	17	17	0	0	0	0	0
Алтай (Бийск, Россия), 2008	29	21	0	0	0	8	0
Алтай (с. Черга и с. Иогач), 2008	45	21	1	0	0	23	0
Украина (Умань), 2008	16	12	0	0	0	4	0
Украина (Алушта, Крым), 2010	55	26	0	1	0	28	0
Украина (Изобильное, Крым), 2010	223	127	0	3	0	93	0
Украина (Умань), 2012	12	5	0	0	0	7	0
Украина (Киев), 2012	13	11	0	0	0	2	0
Кабардино-Балкария (Нальчик), 2010	85	61	0	0	0	23	1
Кабардино-Балкария (Нальчик), 2012	103	60	0	1	0	39	3
Кабардино-Балкария (Нальчик), 2013	66	43	0	1	0	22	0
Узбекистан (Ташкент), 2008	16	13	1	0	0	2	0
п-ов Синай (Египет), 2010	24	14	0	0	7	3	0
Франция (Монпелье), 2010*	18	6	0	0	0	12	0
Швеция (Гётеборг), 2012	57	50	0	0	0	7	0
ВСЕГО:	836	525	2	6	7	292	4

*- линии предоставлены Р. R. Haddrill.

Разнообразие митотипов *D. melanogaster* в природных популяциях

Обнаружение ассоциации митотипов *D. melanogaster* с генотипами *Wolbachia* (Pinsky, Zakharov, 2006; Илинский, Захаров, 2007) дало возможность проведения анализа митотипического разнообразия *D. melanogaster* в природных популяциях (табл. 1). В этом случае стоит учесть, что митотипы необходимо рассматривать как

среди неинфицированных, так и среди инфицированных особей. Таким образом, можно оценить распространенность митотипа во всей популяции. По результатам проведенного исследования 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 %. Вообще, ассоциация генотипа *Wolbachia* и митотипа *D. melanogaster* определяется термином «цитотип». С учетом статуса инфицированности и генотипа *Wolbachia*, выделяют четыре цитотипа *D. melanogaster*: *M-MEL*, *M-w⁻*, *S-CS* и *S-w⁻* (Ilinsky, 2013). Таким образом, доля митотипа *M* в природных популяциях *D. melanogaster* с учетом частот цитотипов *M-MEL* и *M-w⁻* составит более 90 %. Соответственно, цитотип *S* будет встречаться в популяциях с частотами менее 10 %. Эти данные согласуются с результатами проведенного исследования разнообразия митотипов *D. melanogaster* в природных популяциях.

Цитотипическое разнообразие лабораторных линий *D. melanogaster*

При анализе 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).

Таблица 2. Цитотипы мутантных линий *Drosophila melanogaster* фонда
Лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО 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.

Исследование показало наличие среди линий фонда четырех цитотипов: *M-MEL*, *M-w⁻*, *S-CS*, *S-w⁻* (табл. 2), что согласуется с данными исследований природных популяций (Ilinsky, 2013). Наибольшее число линий – 40 %, представлено цитотипом *S-w⁻*. Частота встречаемости оставшихся трех цитотипов варьирует от 17 до 22 %. Несовпадение между данными по представленности цитотипов в природе и среди лабораторных, а также между разными группами линий объясняется историей ведения линий в лаборатории. Так, преобладание

линий с цитотипом *S-w* связано с тем, что при их создании за основу была взята линия, обладающая этим цитотипом.

Динамика цитотипов *Drosophila melanogaster* в экспериментальных популяциях

В ходе эксперимента по изучению динамики разных генотипов *Wolbachia* в экспериментальных популяциях *D. melanogaster* было собрано, разделено по полу, подсчитано и зафиксировано в 96 % этиловом спирте 11 неперекрывающихся между собой поколений мух из каждого популяционного ящика. Также было собрано 20-е поколение, полученное после 11-го свободным скрещиванием дрозофил.

Условиями эксперимента были исключены известные факторы, способные инициировать мутуалистическое влияние *Wolbachia* на *D. melanogaster* (Harcombe, Hoffmann, 2004; Вайсман и др., 2009; Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008; Ikeya *et al.*, 2009; Clark *et al.*, 2005; Starr, Cline, 2002), а также влияние генетического фона, поскольку использованные для постановки эксперимента линии имели выровненный ядерный фон.

Однако такие факторы, как индуцируемая *Wolbachia* ЦН, неполная материнская передача бактерии, а также возможное различие в плодовитости самок не могли быть исключены нами из эксперимента. Таким образом, данные факторы могли бы 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):

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

В данной модели учтены уровень ЦН (S_h), относительная плодовитость инфицированных самок по сравнению с неинфицированными (F) и уровень неполной материнской передачи (μ), а p_t и p_{t+1} – частота цитотипа в текущий и последующий моменты времени, соответственно.

В контрольной популяции, неинфицированной *Wolbachia*, было обнаружено увеличение уже ко второму поколению доли мух с митотипом «*M*» до 90 % (рис. 1). Можно было бы предположить, что данный митотип дает преимущество несущим его особям, по сравнению с митотипом «*S*». Однако при анализе динамики произошедших изменений было обнаружено, что в последующих поколениях достоверных изменений частоты митотипа «*M*» не произошло и в 20-м поколении доля данного митотипа составила 92 %. При повторной постановке данной популяции при тех же условиях мы не обнаружили достоверных изменений частот митотипов, однако в первом поколении незначительно увеличилась доля особей с митотипом «*M*» до 67 %. Таким образом, на основании полученных

данных мы предполагаем отсутствие влияния митотипа на динамику экспериментальных популяций *D. melanogaster*.

Во второй и третьей популяциях, где *Wolbachia* представлена только одним из двух генотипов (wMel и wMelCS, соответственно), было обнаружено увеличение доли инфицированных мух до 83 и 78 % соответственно (рис. 1). Полученные значения согласуются с наблюдаемыми частотами инфицированности в природных популяциях *D. melanogaster*.

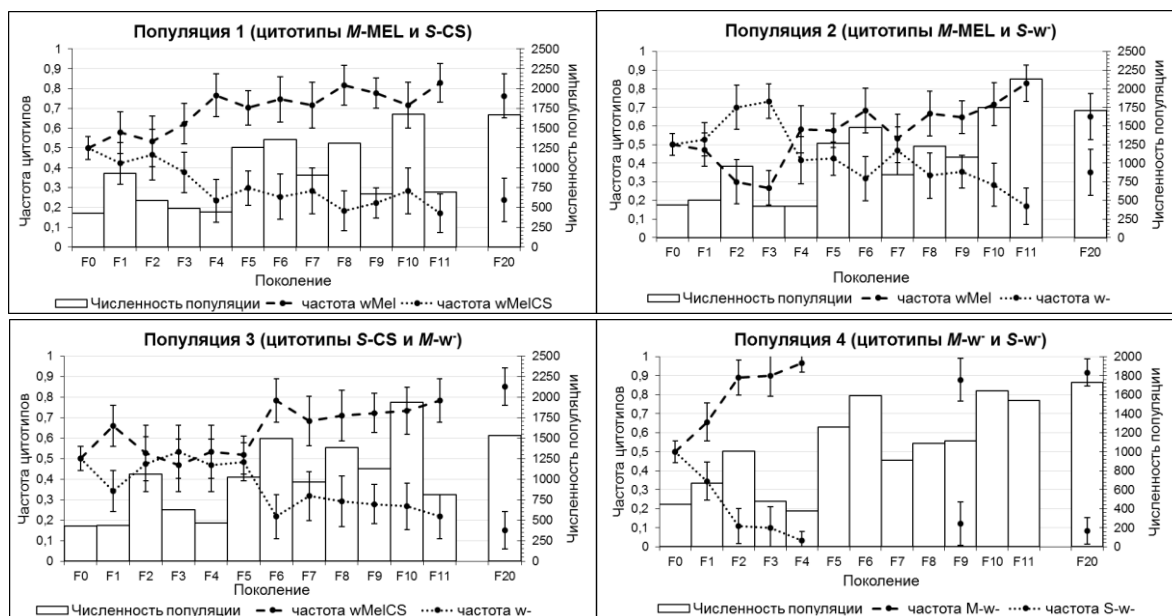


Рис. 1. Динамика цитотипов в четырех экспериментальных популяциях *D. melanogaster*

При дальнейшем анализе было обнаружено, что во второй популяции, инфицированной *Wolbachia* генотипа wMel, изначально произошло уменьшение уровня инфицированности к третьему поколению до 27 %, после чего доля инфицированных мух резко возросла до 58 % в четвертом поколении и не изменилась до пятого поколения. В шестом поколении уровень инфицированности увеличился до 68 %. К 20-му поколению не наблюдалось фиксации инфицированности, а доля инфицированных мух составила 65 %. В третьей популяции, инфицированной *Wolbachia* генотипа wMelCS, на протяжении пяти поколений соотношение инфицированных и неинфицированных мух достоверно не изменялось. В шестом поколении произошло резкое увеличение доли инфицированных особей до 78 % и в дальнейшем до 20-го поколения она достоверно не изменялась. В двух рассматриваемых популяциях могла проявляться индуцированная *Wolbachia* ЦН. По литературным данным, эта аномалия в популяциях *D. melanogaster* выражена слабо и находится на уровне 10 – 20 %, т.е. $0,1 < S_h < 0,2$ (Hoffmann *et al.*, 1994; Илинский, 2008; Илинский, Захаров, 2009). Используя описанную выше математическую модель и учитывая, что в ходе исследования мы не обнаружили фактов неполной материнской передачи

Wolbachia, а также предполагая одинаковую плодовитость инфицированных и неинфицированных особей, мы провели сравнение экспериментальных данных с теоретическими для значений $S_h = 0, 1$ и $S_h = 0,2$ (рис. 2). Около половины полученных в эксперименте значений частот инфицированности не укладывается в промежуток между графиками, построенными на основании литературных данных о максимальном и минимальном уровнях ЦН в популяциях *D. melanogaster*.

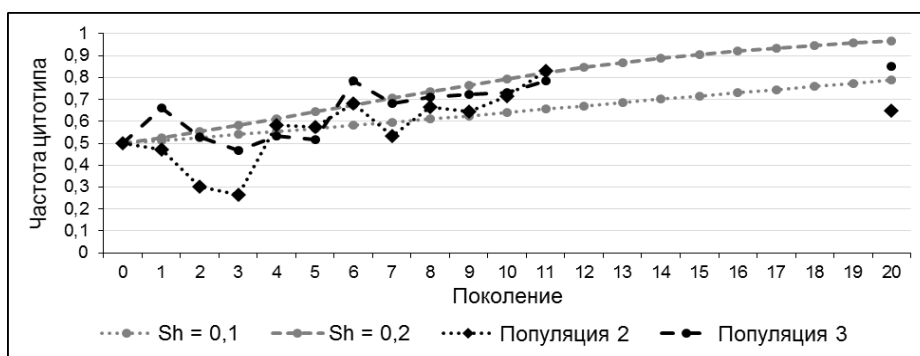


Рис. 2. Сравнение теоретической и наблюдаемой динамики цитотипов *M-MEL* и *S-CS* *D. melanogaster* во второй и третьей экспериментальных популяциях, соответственно, в течение 20 поколений при разных значениях уровня ЦН.

Начиная с седьмого поколения полученные в эксперименте значения попадают в этот промежуток. Мы предполагаем, что наблюдаемые изменения частот инфицированности на протяжении с 7-го по 11-е могут быть результатом проявления ЦН на уровне около 15 % или меньше. Остальные изменения, по нашим предположениям, обусловлены влиянием генетического дрейфа.

В первой популяции, где представлены два генотипа *Wolbachia* wMel и wMelCS мы обнаружили, что к 11-му поколению доля особей, инфицированных бактерией wMel-генотипа, увеличилась до 83 % (рис. 1). 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; Pinsky, 2013). При дальнейшем анализе было обнаружено, что резкие изменения произошли в третьем и четвертом поколениях, когда доля *D. melanogaster* с цитотипом *M-MEL* увеличилась с 53 до 77 %. Начиная с четвертого поколения соотношение цитотипов достоверно не изменялось и в 20-м поколении вернулось к уровню 76 %. Подобная динамика наблюдалась в контрольной популяции, где в первых поколениях произошло резкое увеличение доли особей с митотипом «*M*».

Мы не рассматриваем в данной популяции влияние ЦН, поскольку исследования несовместимости между генотипами *Wolbachia* wMel и wMelCS не проводились. Следовательно из возможных факторов в данном случае 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).

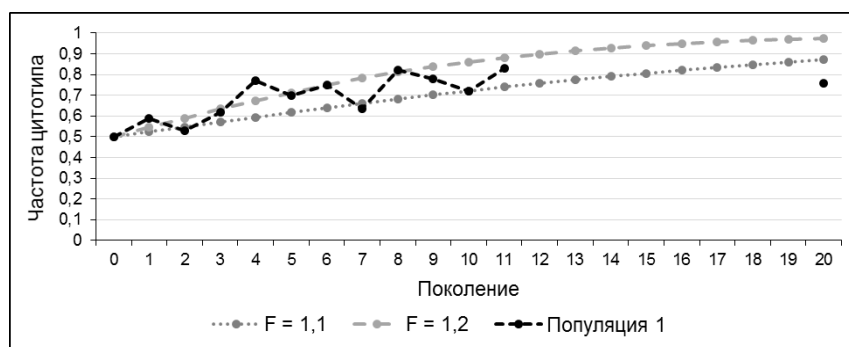


Рис. 3. Сравнение теоретической и наблюдаемой динамики *D. melanogaster*, инфицированных *Wolbachia* генотипа wMel, в первой экспериментальной популяции в течение 20 поколений при разных значениях относительной плодовитости F .

Почти все полученные в эксперименте значения попадают в область между графиками, соответствующими предполагаемым верхней и нижней границам для значений относительной плодовитости F . В данном случае значение относительной плодовитости F 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, приведенных на рис. 3, 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 к 20-му поколению в эксперименте мы наблюдаем уменьшение частоты цитотипа M-MEL, что не соответствует теоретическим предположениям. 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 *D. melanogaster*, а наблюдаемые изменения частот цитотипов в первой экспериментальной популяции обусловлены генетическим дрейфом.

На основании полученных данных предполагается, 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. 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 работ, опубликованных по теме диссертации

1. Быков Р.А., Курильщикова А.М. Оценка инфицированности *Wolbachia* сборов из природных популяций *Drosophila melanogaster* 2008 года // В кн.: Материалы 47 Международной научной студенческой конференции “Студент и научно-технический прогресс”, Биология. Новосибирск, 11-15 апреля 2009 г. - Новосибирск, НГУ. 2009. С. 155-156.
2. Курильщикова А.М., Быков Р.А. Анализ представленности *Wolbachia* и гаплотипов митохондриальной ДНК *Drosophila melanogaster* в природных популяциях // В кн.: 16 Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов - 2009”, Секция “Биология”. Москва. 13-18 апреля 2009 г. Тезисы докладов. – Москва: Макс-Пресс 2009. С. 93-94.
3. Быков Р.А., Курильщикова А.М., Илинский Ю.Ю., Захаров И.К. Генотипическое разнообразие эндосимбионта *Wolbachia* в популяциях *Drosophila melanogaster* // Съезд генетиков и селекционеров, посвященный 200-летию со дня рождения Ч. Дарвина. 5 съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров. Москва, 21-28 июня 2009 г. Часть 2. – Москва. 2009. С. 205.
4. Быков Р.А. Динамика инфицированности природных и экспериментальных популяций *Drosophila melanogaster* разными генотипами эндосимбионта *Wolbachia* // В кн.: Материалы 48 Международной научной студенческой конференции “Студент и научно-технический прогресс”, Биология. Новосибирск, 10-14 апреля 2010 г. - Новосибирск, НГУ. 2010. С. 218.
5. Ilinsky Yu.Yu., Bykov R.A., Zakharov I.K. The symbiotic association of *Wolbachia-Drosophila melanogaster*, biology and genetics // 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”: Abstracts, Papers by Young Scientists. Alushta, 9-14 October 2010. – Dubna: JINR. 2010. P. 142
6. Илинский Ю.Ю., Быков Р.А., Захаров И.К. Генетическое разнообразие митохондриальной ДНК *Drosophila melanogaster* зависит от сонаследования *Wolbachia* // Программа фундаментальных исследований Президиума РАН. № 11. “Биологическое разнообразие”. Подпрограмма “Генофонды и генетическое разнообразие”. Сборник материалов. – Москва: ИОГен. 2011. С. 39-40.
7. Быков Р.А., Струнов А.А., Жукова М.В., Калмыкова Е.А., Илинский Ю.Ю., Киселева Е.В., Захаров И.К. Полиморфизм природных популяций – влияние факторов внешней среды и взаимодействие генов и геномов в симбиотической системе «*Wolbachia-Drosophila melanogaster*» // Программа фундаментальных исследований Президиума РАН. “Биологическое разнообразие”. Подпрограмма

“Генофонды и генетическое разнообразие”. Материалы отчетной конференции. – Москва: ИОГен. 2011. С. 54-56.

8. Захаров И.К., Ваулин О.В., Илинский Ю.Ю., Быков Р.А. и др. Генетика природных и экспериментальных популяций дрозофил // Международная конференция “Проблемы популяционной и общей генетики”, Москва. 14-16 ноября 2011 г. Международная молодежная конференция “Популяционная генетика: современное состояние и перспективы”, Москва. 17-18 ноября 2011 г. Сборник тезисов. – М.: “Цифровичок”. 2011. С. 68.

9. Быков Р.А., Илинский Ю.Ю. Динамика инфицированности экспериментальных популяций *Drosophila melanogaster* двумя генотипами эндосимбионта *Wolbachia* // Экология: традиции и инновации. Материалы конференции молодых ученых, 9-13 апреля 2012, г. Екатеринбург, ИЭРиЖ УрО РАН / Екатеринбург: Голицынский. 2012. С. 16-19.

10. Илинский Ю.Ю., Юдина М.А., Калмыкова Е.А., Быков Р.А., Высочина Н.П., Винарская Н.П., Захаров И.К. Инфицированность эндосимбиотической бактерией *Wolbachia* видов блох (Siphonoptera: Insecta) Свердловской области и Хабаровского края // Экологическая генетика. 2013. Т. 11. – С. 32-35.

11. 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.

12. Илинский Ю.Ю., Быков Р.А., Захаров И.К. Эволюция и генетика симбиотической системы *Drosophila melanogaster-Wolbachia* // VI съезд ВОГиС и ассоциированные генетические симпозиумы, Ростов-на-Дону, 15 – 20 июня 2014 г. Тезисы докладов. – Новосибирск. ФГУП «Издательство СО РАН». 2014. С. 5.

13. Быков Р.А., Илинский Ю.Ю. Динамика факторов материнской наследственности в экспериментальных популяциях *Drosophila melanogaster* // VI съезд ВОГиС и ассоциированные генетические симпозиумы, Ростов-на-Дону, 15 – 20 июня 2014 г. Тезисы докладов. – Новосибирск. ФГУП «Издательство СО РАН». 2014. С. 189.

14. Ilinsky Y., Bykov R., Yudina M., Weisman N., Zakharenko L., Ignatenko O., Gruntenko N., Karpova E., Zakharov I. Maternal inheritance of long-established laboratory *Drosophila melanogaster* stocks // 8th International Wolbachia Conference 6 – 11 June 2014 Igls, Innsbruck, Austria.

15. 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.