

ІДЕНТИФІКАЦІЯ РІДКІСНИХ ГЕНОТИПІВ *WOLBACHIA* У ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

О. Майстренко, С. Серга, І. Козерецька

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

ННЦ «Інститут біології»

вул. Володимирська, 64, Київ 01601, Україна

e-mail: o.m.maistrenko@gmail.com

Отримані здебільшого на невеликих вибірках дані аналізу ізосамкових ліній свідчать, що *Drosophila melanogaster* із різних природних популяцій світу переважно інфікована єдиним генотипом ендосимбіотичної бактерії *Wolbachia*wMel, який, як вважається, розповсюджувався одночасно з 2-м гаплотипом мтДНК дрозофіли, заміщуючи групу генотипів бактерії wMelCS, яка асоційована з 1-м гаплотипом мтДНК. У деяких популяціях спостерігається присутність обох генотипів, що вказує на неповне або незавершене заміщення. Використання прийнятого підходу показало переважання генотипу wMel у природних популяціях *D. melanogaster* України. Проте генотипування на більшій вибірці ізосамкових ліній продемонструвало наявність обох генотипів бактерії у дрозофіл популяції м. Умань. Такий результат може свідчити про значно більше поширення генотипу wMelCS у природних популяціях дрозофіли України і світу, а також про існування механізмів, які забезпечують збереження цього генотипу бактерії у популяціях дрозофіл.

Ключові слова: *Wolbachia*, *Drosophila melanogaster*, генотипування, гаплотип мтДНК.

Wolbachia pipientis – поширена ендосимбіотична альфа-протеобактерія, яка інфікує дві третини досліджених видів комах та інших безхребетних тварин [5]. Передача бактерії наступному поколінню здійснюється майже виключно трансваріальним шляхом. Успішне поширення даної бактерії пояснюють ефектами репродуктивного маніпулювання та/або адаптивними перевагами, які *Wolbachia* надає інфікованим організмам порівняно з неінфікованими [14]. У той же час у низки видів організмів-господарів даної бактерії, зокрема у *Drosophila melanogaster*, не зафіксовано видимих впливів *Wolbachia*, які могли би сприяти її розповсюдженню та збереженню в популяції даного виду [6].

D. melanogaster є зручним об'єктом для вивчення генетичного різноманіття і спектра впливів *Wolbachia* завдяки її космополітичності, великому розміру популяцій і стандартизованому протоколу лабораторного культивування. У природних популяціях даного виду описаний лише один штам бактерії wMel, який поширився по всьому світу [13]. Для більш детальної класифікації *Wolbachia*, що інфікує *D. melanogaster*, було запропоновано розділити даний штам на дві групи генотипів – wMel і wMelCS згідно з п'ятьма маркерами: за кількістю двох видів тандемних повторів (VariableNumberofTandemRepeats; VNTR) – VNTR-141 та VNTR-105, наявністю вставок інсерційної послідовності IS5 (Insertionsequence 5) у двох локусах геному *Wolbachia* та напрямку інверсії [13].

Генотип *Wolbachia* групи wMelCS трапляється переважно в ізосамкових лініях, започаткованих у першій половині ХХ ст., тоді як у сучасних популяціях переважають генотипи групи wMel. На основі цього факту було зроблено припущення про заміщення генотипів бактерії групи wMelCS генотипами wMel у середині минулого століття. Пізніші

дослідження представників природних популяцій виявили, що заміщення генотипів групи wMelCS на генотипи групи wMel може бути неповним, наприклад, у популяціях Кавказу та Середньої Азії (Ташкент), де наявні по три генотипи *Wolbachia* – wMelCS, wMelCS2 та wMel [13]. У вибірках з популяцій України виявлено генотип wMel, і лише в м. Умань було знайдено більш рідкісний генотип wMelCS2 [13].

Визначення гаплотипів мтДНК у дослідженні ендосимбіонтів проводиться для встановлення наявності асоціації між геномом симбіонта і мітохондріальним геномом та/або геномом організму-господаря [3, 4, 7, 8, 12]. Зокрема, внаслідок сумісної вертикальної передачі *Wolbachia* та мітохондрій *D. melanogaster* виникає асоційоване успадкування певних генотипів бактерії та гаплотипів ДНК мітохондрій дрозофіли. Як один із маркерів, покладений в основу класифікації мітохондріального геному *D. melanogaster* на гаплотипи, використовують послідовність гена першої субодиниці цитохром С оксидази (CoI). Серед 18 гаплотипів, ідентифікованих в ізосамкових лініях, зібраних у світі, найпоширенішим є гаплотип 2, який трапляється на всіх континентах. Наявність широкого різноманіття гаплотипів мтДНК на фоні значного розповсюдження лише одного з них свідчить про недавню хвилю розселення особин дрозофіли з цим гаплотипом [9]. Зіставлення даних щодо генотипів *Wolbachia* з розподілом гаплотипів мтДНК дрозофіли показало, що у природних популяціях *D. melanogaster* Європи заміщення генотипів бактерії відбулось одночасно із заміщенням гаплотипу 1, який асоційований з wMelCS, на 2-й і 10-й гаплотипи мтДНК, які асоційовані з генотипом wMel [10]. Таким чином, генотипування *Wolbachia* з ізосамкових ліній *D. melanogaster* різних куточків світу показало, що генотип wMel значно поширеніший, ніж усі інші генотипи бактерії [13]. Проте більшість робіт із аналізу генотипів *Wolbachia* здійснено на невеликих вибірках із великої кількості природних популяцій світу. Крім того, для аналізу здебільшого використовували ізосамкові лінії, які довгий час утримувались у лабораторних умовах, що може не відображати реальної ситуації в природі. Тому особливості поширення генотипів *Wolbachia* безпосередньо у природних популяціях *D. melanogaster*, а не в ізосамкових лініях залишаються дослідженими фрагментарно, що не дає змоги зробити остаточні висновки про генетичну різноманітність *Wolbachia* у природі.

Отже, метою даної роботи було дослідити генетичне різноманіття *Wolbachia* та гаплотипів мтДНК *D. melanogaster* безпосередньо у природних популяціях даного виду України й оцінити відповідність отриманих даних із результатами аналізу ізосамкових ліній, який прийнятий у сучасних дослідженнях даного ендосимбіонта.

Матеріали та методи

Місця збору *D. melanogaster*. Збір особин із природних популяцій проводили в кінці літнього періоду (серпень-вересень) 2011 р. в 11 локалітетах. Вибірки з природних популяцій проведено на території заводів із переробки фруктів (Умань, Варва і Ялта), у фруктових садах (Київ, Дрогобич, Умань, Мотовилівка, Одеса та Пирятин) і у Чорнобильській зоні відчуження (Чорнобиль, Водойма-охолоджувач ЧАЕС, Рудий ліс), де використовувалися пастки з відповідним субстратом.

Екстракція ДНК. Екстракцію ДНК проводили з 10–12 мух нащадків першого покоління від трьох самок із кожної популяції з використанням комплекту реагентів «ДНК-сорб-В» (АмпліСенс, Росія) згідно з протоколом, запропонованим виробником. Крім того, в чотирьох популяціях було проаналізовано від 16 до 32 ізосамкових ліній.

Ідентифікація *Wolbachia*. Присутність бактерії роду *Wolbachia* в досліджуваних ізосамкових лініях визначали методом ПЛР з використанням праймерів (5'-САТАССТАТТССГААГГГАТАГ, 5'-АГСТТССГАТГААСССААТТС), специфічних до консервативного фрагмента гена 16S рРНК довжиною 438 п.н. [11] за таких умов:

денатурація 3 хв при 94°C, 25 циклів (денатурація 30с/94°C, відпал праймерів 40с/56°C, синтез 40с/72°C), заключний синтез 5 хв при 72°C. Реакції відбувалися в суміші об'ємом 20 мкл (2 мкл ДНК (5 нг), 2 мкл 10 x ПЛР буфера з KCl («ThermoScientific»), 2 мкл 25 mM MgCl₂, 2 мкл 2,5 mM dNTP («ThermoScientific»), 2 мкл 20 mM праймерів, 0,25 мкл Taq-полімерази (5 у/мкл, «ThermoScientific»), 8 мкл дистильованої води). Фракціонування продуктів ПЛР проводили в 1% агарозному гелі в тріс-боратній буферній системі.

Генотипування *Wolbachia* з природних популяцій України. Ідентифікацію генотипів *Wolbachia* в українських популяціях *D. melanogaster* проводили за допомогою ПЛР-аналізу (табл. 2) для встановлення кількості повторів міні-сателітів VNTR-141, VNTR-105 та виявлення вставки інсерційного елемента IS5 у локусах WD0615/7 та WD1310 згідно з Riegler et al. [13].

Таблиця 1

Праймери та умови проходження ПЛР при генотипуванні *Wolbachia*

Продукт апліфікації	Послідовності праймерів	Температура відпалу праймерів	Довжина ампліконів, пн.		Позиція локусу в геномі (відносно геному wMel)
			wMelCS	wMel	
VNTR-141	VNTR-141-F: GGAGTATTATGATAATGCG, VNTR-141-R: GACTAAAGGTTAGTTGCAT	45°C	1188	1329	89003-90332
VNTR-105	VNTR-105-F: GCAATTGAAAATGTGGTGCC VNTR-105-R: ATGACACCTTACTTAACCGTC	52°C	1241	1346	1080207-1081553
IS5-WD0615/7	IS5-WD0615/7-F: CCATCAAGGTCTCTTTCA IS5-WD0615/7-R: TGCAAGGAAAATAAACCAG	48°C	1600	2500	507322-509810
IS5-WD1310	IS5-WD1310-F: AGGAGAAGTGGTCTACGC IS5-WD1310-R: TGTTGCTGAGCTTTGCT	52°C	1600	750	1251363-1252108

Визначення гаплотипів мтДНК *D. melanogaster*. Для визначення гаплотипів мтДНК проводили напрацювання методом ПЛР фрагмента гена першої субодиниці цитохром С оксидази (*CoI*) з 927 по 1477 п.н. з використанням праймерів CoI-F-TCTACATCTATTCCAAACGGT та CoI-RAGCTTGAGCTGGAATAGTTG-3'. Очищення ампліконів фрагмента гена CoI для секвенування проводили за допомогою QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, USA) згідно з протоколом, запропонованим виробником.

Секвенування ПЛР-продуктів проводили на автоматичному секвенаторі Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer в Університеті Південної Кароліни, США.

Обробку отриманих послідовностей виконували за допомогою програм FinchTV (Geospiza, Inc., USA) та VectorNTI (Invitrogen, USA). Послідовності фрагмента гена CoI перевіряли на наявність помилок секвенування, які усували вручну, після чого проводили множинне вирівнювання у програмі VectorNTI (алгоритм ClustalX) з відомими послідовностями цього

гена з бази даних GenBank (ідентифікаційні номери: EF153616.1 – 1-й гаплотип, EF153611.1 – 2-й гаплотип, EF153614.1 – 10-й гаплотип) для встановлення гаплотипів.

Результати і їхнє обговорення

Визначення гаплотипів мтДНК дрозофіли та генотипів *Wolbachia* у трьох ізосамкових лініях *D. melanogaster* із кожної популяції, як описано у Nunesetal [10], засвідчило наявність лише генотипу бактерії wMel у всіх досліджених популяціях України (рис. 1). Однак такий аналіз може не відображати реальної ситуації у природних популяціях суто зі статистичних причин, тому було проведено визначення генотипів *Wolbachia* у 23-х ізосамкових лініях Чорнобильської зони (Водойма – охолоджувач ЧАЕС); 20 – м. Києва, 32 – м. Варви та 16 – м. Умані. Розширення розміру вибірок у цих популяціях дало можливість встановити присутність більш рідкісного генотипу *Wolbachia* wMelCS у популяції м. Умань (рис. 1). Дана обставина може свідчити про значно вищу розповсюдженість у природних популяціях цього та інших рідкісних генотипів *Wolbachia*, ніж показано у дослідженнях на невеликих вибірках. Так, було виявлено в одній ізосамковій лінії з популяції Поліського, що поблизу Чорнобильської АЕС, генотип, який не відповідає прийнятій класифікації, оскільки за локусами WD0516/7, WD1310 та кількістю VNTR – 141 визначається як wMel, а за кількістю копій VNTR – 105, як wMelCS. В ізосамкових лініях із природних популяцій Чорнобильської зони, м. Києва та м. Варви виявлено лише генотип wMel.

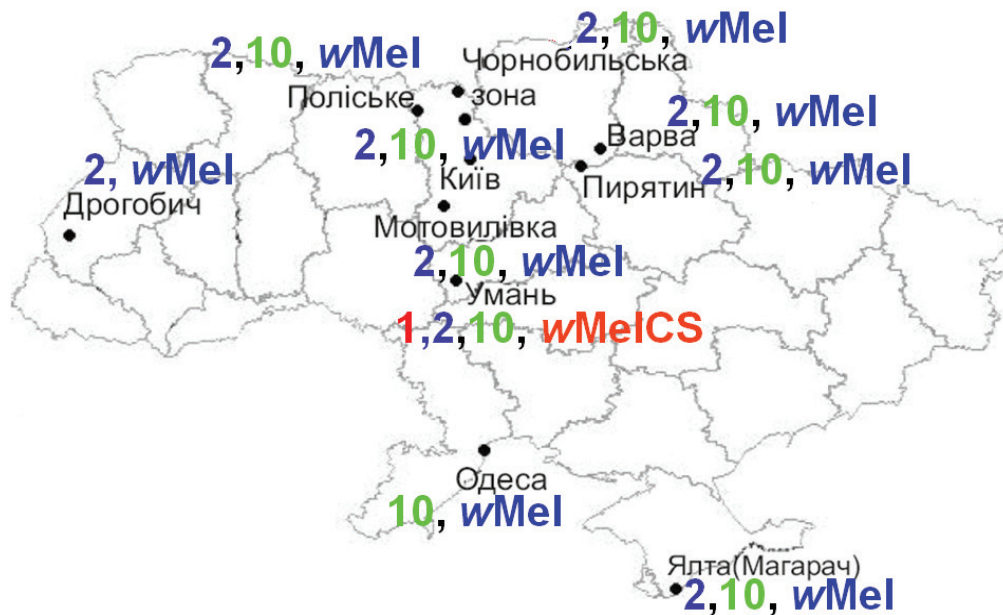


Рис. 1. Розподіл гаплотипів мтДНК *D. melanogaster* і генотипів *Wolbachia* у природних популяціях дрозофіл України (цифри відображають номери гаплотипів мтДНК *D. melanogaster*).

Переважаання генотипу wMel у природних популяціях дрозофіли України узгоджується з гіпотезою про заміщення генотипів *Wolbachia* wMelCS та/або wMelCS2 на wMel [13]. У працях Ю. Ілінського та І. Захарова з генотипування у вибірці з популяції даного регіону також показано наявність генотипів wMelCS2 і wMel [1]. Одночасна присутність генотипів wMelCS та/або wMelCS2 та/або wMel в одній популяції раніше показана в популяціях Алтаю і Азії, у яких це явище розповсюджене. У Східній Європі така ситуація є радше винятком, адже подібна картина була раніше описана тільки в Умані [1].

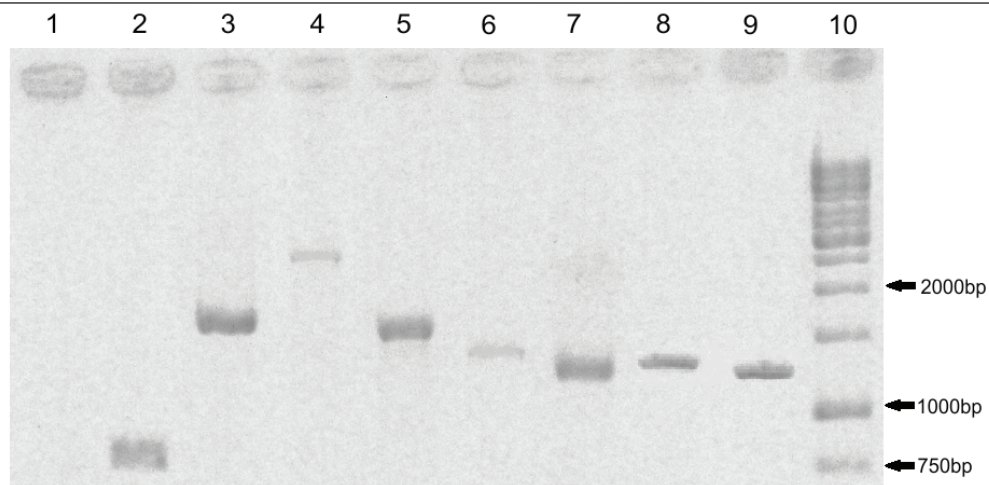


Рис. 2. Електрофореграма ампліконів чотирьох маркерів двох генотипів *Wolbachia wMel* та *wMelCS*: 1 – негативний контроль (ДНК неінфікованої ізосамкової лінії); 2, 3 – вставка інсерційного елемента IS5 у локусі WD1310 (2 – *wMel*, 3 – *wMelCS*); 4, 5 – вставка інсерційного елемента IS5 у локусі WD0615/7 (4 – *wMel*, 5 – *wMelCS*); 6, 7 – VNTR–105 (6 – *wMel*, 7 – *wMelCS*); 8, 9 – VNTR–141 (8 – *wMel*, 9 – *wMelCS*); 10 – маркерна ДНК (O'GeneRuler 1kbDNALadder, «ThermoScientific»).

Ідентифікація гаплотипів мтДНК дрозофіли проводилася для перевірки сумісного успадкування мітохондрій та ендосимбіотичної бактерії *Wolbachia*, які передаються трансваріально. Секвенування фрагмента гена *CoI* показало наявність 2-го та 10-го гаплотипів у більшості природних популяцій України, і лише в популяції м. Умань виявлений 1-й гаплотип (рис. 1). Також у попередніх дослідженнях показано наявність 1-го гаплотипу в Чорнобильській зоні [2]. При цьому майже у всіх популяціях одночасно наявні гаплотипи 2-й і 10-й, окрім м. Дрогобич, де виявлено тільки 2-й гаплотип, і м. Одеса, де був встановлений тільки 10-й гаплотип. 2-й і 10-й гаплотипи поширені у Європі, а 1-й гаплотип трапляється рідше і характерний для країн Балканського півострова, Франції, Іспанії [9], а також для України [2].

Детальний аналіз мтДНК 14 досліджуваних ліній з м. Умань показав наявність 1-го, 2-го, 10-го гаплотипів, частка яких становила приблизно 42, 29 та 29% відповідно. Таким чином, використання більших вибірок може дати змогу не тільки детектувати мінорні генотипи *Wolbachia* у природних популяціях *D. melanogaster*, а й також встановити наявність чи відсутність асоціації між генотипом бактерії та гаплотипом мтДНК дрозофіл у межах популяції.

Інфікування *Wolbachia* встановлено у ліній з 10-м, 2-м і 1-м гаплотипами. При цьому у 35% інфікованих ліній ідентифіковано 2-й гаплотип, а у 45% – 10-й, на 1-й гаплотип припадало 16% (табл. 2).

Цікаво, що серед п'яти ізосамкових ліній із 1-м гаплотипом три лінії інфіковані *Wolbachia* генотипу *wMelCS*, одна лінія з генотипом *wMel* та одна лінія не інфікована. Також раніше було знайдено в Чорнобильській зоні самку з 1-м гаплотипом, яка не була інфікована [2]. Одна лінія з 10-м гаплотипом була інфікована вольбахією генотипу *wMelCS*. Такі результати в цілому узгоджуються з гіпотезою про асоціацію 1-го гаплотипу з генотипом вольбахії *wMelCS*, а 2-го та 10-го з *wMel*, але демонструють, що така асоціація не абсолютна (табл. 2).

Розподіл генотипів *Wolbachia* між гаплотипами мтДНК *D. melanogaster*
з вибірок 2011 року

Гаплотип мтДНК <i>D. melanogaster</i>	Генотип <i>Wolbachia</i>			
	wMel	wMelCS	Не інфіковані	Новий генотип
1	1	4	1	0
2	11	0	5	0
10	13	1	4	1

Таким чином, ідентифіковано 2 генотипи *Wolbachia* – wMel та wMelCS і 3 гаплотипи мтДНК – 1-й, 2-й, 10-й у популяціях *D. melanogaster* України. Показано, що використання вибірок у розмірі трьох ізосамкових ліній із кожної популяції для генотипування обмежено репрезентує розповсюдження генотипів бактерії в межах відповідної популяції. Більш інформативним є розширення вибірки хоча б до 15 особин із кожної популяції.

Автори висловлюють подяку д.б.н. Г. П. Мілевському, к.б.н. І. А. Чижевському, к.б.н. Р. А. Якимчуку та співробітникам біологічного факультету Одеського національного університету ім. І. І. Мечникова і співробітникам Національного інституту винограду та вина «Магарач» за допомогу в зборі мух, а також проф. Т. Мюссе (Університет Південної Кароліни, США) за допомогу в секвенуванні зразків.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Илинский Ю., Захаров И. Эндосимбионт *Wolbachia* в евразийских популяциях *Drosophila melanogaster* // Общая генетика. 2007. Т. 43. №7. С.905–915.
2. Рожок А. И., Серга С. В., Демидов С. В., Козерецкая И. А. Распространение гаплотипов мтДНК в популяциях *Drosophila melanogaster* Украины // Проблемы экологической та медичної генетики та клінічної імунології. 2011. Т. 6. С. 47–54.
3. Ballard W. J. O., Whitlock M. C. The incomplete natural history of mitochondria // Mol. Ecol. 2004. Vol. 13. N 4. P. 729–744.
4. Dean M. D., Ballard K. J., Glass A., Ballard J. W. O. Influence of two *Wolbachia* strains on population structure of East African *Drosophila simulans* // Genetics. 2003. Vol. 165. N 12. P. 1959–1969.
5. Hilgenboecker K., Hammerstein P., Schlattmann P. et al. How many species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data // FEMS Microbiol. 2008. Vol. 281. P. 215–220.
6. Hurst G. D., Jiggins F. M. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population inherited symbionts phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts // Proc. R. Soc. London Ser. 2005. Vol. 272. P. 1525–1534.
7. Ilinsky Y. Coevolution of *Drosophila melanogaster* mtDNA and *Wolbachia* Genotypes // PLoS ONE. 2013. Vol. 8. N 1. e54373.
8. Lachaise D., Cariou M. L., David J. R. et al. Historical biogeography of the *Drosophila melanogaster* species subgroup // Evol. Biol. 1988. Vol. 22. P. 159–225.
9. Nunes M. D. S., Neumeier H., Schlötterer C. Contrasting pattern of natural variation in global *Drosophila melanogaster* populations // Mol. Ecol. 2008. Vol. 17. P. 4470–4479.
10. Nunes M. V. N., Schlötterer C. Non-Random *Wolbachia* Infection Status Of *Drosophila melanogaster* Strains With Different MtDNA Haplotypes // Mol. Biol. Evol. 2008. Vol. 25. N 11. P. 2493–2498.
11. O'Neill S. L., Hoffmann A. A., Werren J. H. Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction. Oxford University Press, 1997. 214 p.

12. Richardson M. F., Weinert L. A., Welch J. J. et al. Population Genomics of the *Wolbachia* Endosymbiont in *Drosophila melanogaster* // PLoS Genet. 2012. Vol. 8. N 12. e1003129.
13. 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. N 15. P. 1428–1433.
14. Werren J. H. Biology of *Wolbachia* // Annu. Rev. Entomol. 1997. Vol. 42. P. 587–609.

Стаття: надійшла до редакції 10.01.14

доопрацьована 31.03.14

прийнята до друку 07.05.14

IDENTIFICATION OF RARE GENOTYPES OF *WOLBACHIA* IN NATURAL POPULATIONS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

O. Maistrenko, S. Serga, I. Kozeretska

Taras Shevchenko National University of Kyiv, ESC "Institute of Biology"

64, Volodymyrska St., Kyiv 01601, Ukraine

e-mail: o.m.maistrenko@gmail.com

Wolbachia genotype wMel prevails worldwide in natural populations of *Drosophila melanogaster*. wMel genotype spread jointly with mtDNA haplotype 2 of fruitfly in natural populations replacing wMelCS and/or wMelCS genotypes which are associated with haplotype 1 of mtDNA. Presence of both genotypes of *Wolbachia* in some populations indicates that replacement is incomplete. Along with prevalence of wMel genotype in Ukrainian natural populations of *D. melanogaster* we observed presence of both genotypes in population of Uman' in case of genotyping more isofemale lines than in previous research. Obtained observation suggests that genotype wMelCS is more widespread in natural populations of fruitfly and/or existence of rarer genotype is maintained by certain specific mechanisms.

Keywords: *Wolbachia*, *Drosophila melanogaster*, genotyping, haplotype of mtDNA.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ РЕДКИХ ГЕНОТИПОВ *WOLBACHIA* В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

О. Майстренко, С. Серга, И. Козерецкая

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, УНЦ

«Институт биологии»

ул. Владимирская, 64, Киев 01601, Украина

e-mail: o.m.maistrenko@gmail.com

Drosophila melanogaster из природных популяций мира преимущественно инфицирована *Wolbachia* генотипа wMel, который распространялся совместно со 2-м гаплотипом мтДНК, замещая генотип wMelCS и/или wMelCS2, которые ассоциированы с 1-м гаплотипом мтДНК. В некоторых популяциях наблюдается наличие обоих генотипов, что может свидетельствовать о неполном или незавершенном замещении. Вместе с преобладанием генотипа wMel в природных популяциях *D. melanogaster* Украины установлено наличие обоих генотипов бактерии у дрозофил популяции г. Умань при условии проведения генотипирования на большей выборке изосамочьих линий нежели в предшествующих исследованиях. Такой результат может свидетельствовать как о большей распространенности генотипа wMelCS в популяциях дрозофил, так и о существовании механизмов, сохраняющих данный генотип в природных популяциях.

Ключевые слова: *Wolbachia*, *Drosophila melanogaster*, генотипирование, гаплотип мтДНК.