

С.В. Серга, И.А. Козерецкая

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,  
ул. Владимирская, 64, 01601, Киев, Украина,  
тел. +38 (044) 522 39 95, e-mail: luchiksveta05@gmail.com

## **WOLBACHIA В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ DROSOPHILA MELANOGASTER УКРАИНЫ**

*Проведено выявление и идентификация бактерий рода Wolbachia в природных популяциях Drosophila melanogaster Украины методом полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров к фрагментам генов 16S рРНК и wsp, с последующим анализом прочтенных последовательностей. Эти бактерии обнаружены в 14 природных популяциях D. melanogaster Украины и относятся к штамму wMel.*

*Ключевые слова: Wolbachia, эндосимбионт, Drosophila melanogaster, ген 16S рРНК, ген wsp.*

*Drosophila melanogaster* является видом-космополитом, который широко распространен на территории Украины [2]. В природе на плодую мушку действует комплекс факторов, которые могут тем или иным образом оказывать влияние на процессы изменчивости в природной популяции [1]. Одним из таких факторов являются широко распространенные бактерии-эндосимбионты, наиболее изученными из которых следует признать бактерии рода *Wolbachia* [14]. Данные бактерии обнаружены в природных популяциях *D. melanogaster* всего мира [9]. Они в пределах вида передаются преимущественно трансвариально и не вызывают типичных модификаций полового размножения, описанных для других насекомых (андроцид, переход к партеногенезу, феминизация и цитоплазматическая несовместимость) [14], кроме низкого уровня цитоплазматической несовместимости [7]. Вместе с тем у многих видов беспозвоночных именно манипулирование половым размножением позволяет бактерии повысить количество инфицированных особей [14]. Следовательно, причины широкого распространения *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster* остаются загадкой.

Ранее нами на основе выявления последовательности гена 16S рРНК была показана широкая распространенность бактерии *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster* Украины [4]. Но так как уровень инфицированности популяции дрозофил бактерией может колебаться и в период диапаузы популяции каждый год подвергаются



эффекту «горлышка бутылки», остается открытым вопрос, всегда ли сохраняется инфицированность определенного уровня в таких условиях. В работе Илинского Ю.Ю. и Захарова И.К. была проведена идентификация бактерий из популяций *D. melanogaster* Евразии. Однако, природные популяции дрозофил Украины в работах этих авторов представлены в основном выборками сборов более чем пятилетней давности, которые содержались на протяжении многих поколений в лаборатории [2]. Этот факт не дает возможности ответить на вопрос, где были эти особи инфицированы — в природе, или в лаборатории, поскольку известно, что возможен горизонтальный перенос инфекции в системе клещ—дрозофила [6, 8]. С учетом сказанного и в связи с возможным влиянием инфицирования на генетические процессы у исследуемых организмов, детальное ежегодное исследование бактерий из природных популяций *D. melanogaster* Украины является крайне необходимым.

Целью работы было выявление *Wolbachia* в выборках из природных популяций *D. melanogaster* Украины, а также идентификация обнаруженных бактерий по последовательности варибельного фрагмента гена поверхностного белка *wsp* (*Wolbachia surface protein*) этого симбионта.

### Материалы и методы

Выборки из природных популяций *D. melanogaster* собраны в летние сезоны (август—сентябрь) 2007, 2008, 2009 и 2010 годов в различных регионах Украины, а именно в Умани, Варве, Лубнах, Пирятине, Магараче (Ялте), Киеве, Одессе, Харькове, Дрогобыче, Мотовиловке и в Чернобыльской зоне.

ДНК выделяли из 25 самок каждой исследуемой природной популяции *D. melanogaster*. Для выделения брались самки, выловленные непосредственно в природе. Выделение ДНК проводили с использованием набора QIAamp DNA Micro Kit (“Qiagen”, США).

Бактериальную ДНК в суммарной ДНК самок определяли с использованием праймеров, которые специфичны к высоко консервативному фрагменту гена 16S рРНК *Wolbachia* длиной 438 п. о. (5'-CAT ACC TAT TCG AAG GGA TAG, 5'-AGC TTC GAG TGA AAC CAA TTC) [13]. ПЦР проводили по схеме: 3 минуты при температуре 94 °С, 30 циклов, состоящих из 30 с при 94 °С, 45 с при 55 °С, 60 с при 72 °С, и 4 минуты при 72 °С. Реакция проводилась в смеси объемом 20 мкл (2 мкл ДНК, 2 мкл 10 x ПЦР буфера (100 мМ Трис-НСl (рН 8,8 при 25 °С), 500 мМ КСl, 0,8% (o/o) Nonidet P40), 2 мкл 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мкл 2,5 мМ dNTP («Fermentas»), 2 мкл 20 мМ праймеров, 0,25 мкл Taq-полимеразы (5 ед./мкл, «Fermentas»), 8 мкл дистиллированной воды). В качестве положительного контроля использовали ДНК из природной популяций *D. melanogaster* г. Киева сбора 2006 года, где диагностировано присутствие этих бактерий [4]. Для негативного контроля использовалась



ДНК лабораторной линии дикого типа *Drosophila virilis*, не содержащей представителей этого эндосимбионта.

Для наработки фрагмента гена поверхностного белка *wsp* были использованы праймеры *wsp81f*-5'TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA и *wsp691r*-5'AAA AAT TAA ACG STA CTC CA [15]. ПЦР проводили по схеме: 3 минуты при температуре 94 °С, 30 циклов, которые состоят из 30 с при 94 °С, 45 с при 55 °С, 60 с при 72 °С, и 4 минуты при 72 °С. Реакция проводилась в смеси объемом 50 мкл (5 мкл ДНК, 5 мкл 10 x ПЦР буфера (мМ Трис-НСl (рН 8,8 при 25 °С), 500 мМ КСl, 0,8% (о/о) Nonidet P40), 5 мкл 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мкл 2 мМ dNTP («Fermentas»), 5 мкл 20 мМ праймеров, 0,75 Таq-полимеразы (5 Ед./мкл, «Fermentas»), 20 мкл дистиллированной воды). Фрагмент гена, который амплифицировался, имел длину 610 п.о. (позиции 81–691) и включал гипервариабельный регион [15].

Фрагменты генов 16S рРНК и *wsp* были наработаны в достаточном количестве и очищены с использованием Gel Extraction Kit («Qiagen», США). Секвенирование было проведено в лаборатории университета Южной Каролины, США. Для секвенирования был использован автоматический секвенатор Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer.

Для идентификации экспериментальных последовательностей использовался инструмент BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) [5]. Сравнительный анализ секвенированных последовательностей проводился с помощью программы ClustalW [12].

### Результаты и их обсуждение

Результаты анализа выборок природных популяций *D. melanogaster* Украины представлены в таблице.

Из 37 проанализированных выборок 16S рДНК бактерии были выявлены в 35 (рис. 1). Отсутствие ДНК *Wolbachia* зафиксировано только в выборке популяции вблизи водоема-охладителя ЧАЭС. Данное явление может объясняться как низкой плотностью популяции дрозофилид, так и низким уровнем инфицированности мух бактерией, так как в сборах 2005 года бактерии там присутствовали. Сравнение полученных результатов с данными сборов 2005 и 2006 годов [3, 4] показывает, что в остальных популяциях *Wolbachia* сохранялась на протяжении 6 лет.

Фрагменты гена 16S рРНК *Wolbachia* из всех исследуемых выборок природных популяций были секвенированы (номера полученных последовательностей в GenBank НМ627277, НМ627278, НМ627279, НМ627280, НМ627281, НМ627282, НМ627283). Сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей показал 100% идентичность фрагментов из всех исследуемых популяций. Полученные экспериментально фрагменты идентичны фрагменту гена 16S рРНК *Wolbachia*, выделенной из *D. melanogaster*, и содержащемуся в GenBank (DQ412083).



Таблица

Результаты анализа выборок природных популяций *D. melanogaster* Украины на наличие гена 16S рДНК *Wolbachia*

Table

Presence of *Wolbachia* 16S rDNA gene in samples of *D. melanogaster* populations from Ukraine

Место сбора	Координаты точек сбора		Год сбора			
	Широта	Долгота	2007	2008	2009	2010
Одесса	46°30'	30°46'	+	+	+	+
Киев	50°35'	30°48'	+	+	+	+
Пирятин	50°14'	32°30'	+	+	н/п	+
Умань	48°45'	30°10'	+	+	+	+
Лубны	50°01'	32°59'	+	+	н/п	н/п
Варва	50°29'	32°43'	+	+	+	+
ЧАЭС	51°37'	30°14'	-	-	+	+
Полесское	51°23'	29°39'	+	н/п	+	+
Чернобыль	51°27'	30°14'	+	+	+	+
Ялта	44°30'	34°90'	+	+	+	+
Харьков	49°49'	36°03'	н/п	н/п	+	н/п
Опушка Рыжего леса	51° 22'	30° 02'	н/п	н/п	н/п	+
Мотовиловка	50°08'	30°05'	н/п	н/п	н/п	+
Дрогобыч	49°21'	23°30'	н/п	н/п	н/п	+

Примечание: «—» отсутствие 16S рДНК бактерии в выборке; «+» присутствие 16S рДНК бактерии в выборке; «н/п» — сборы не проводились.

Для определения штамма *Wolbachia* из природных популяций *D. melanogaster* Украины было использовано сравнение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена поверхностного белка *wsp*, который содержит так называемый вариабельный регион длиной 41 п.н. (позиция 519 –559) [15].



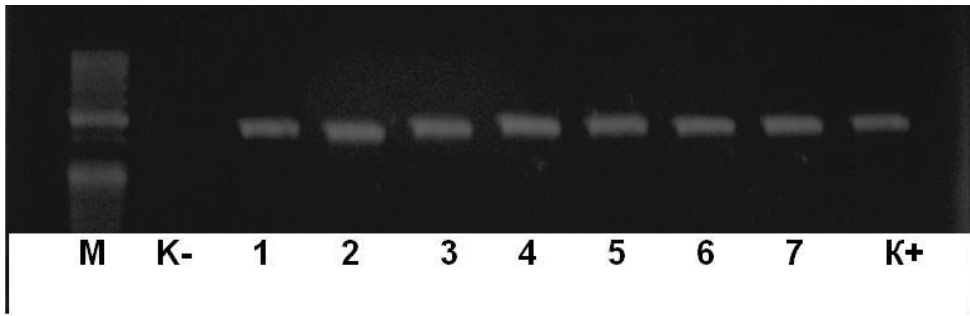


Рис. 1. Результаты идентификации гена 16S рДНК в препаратах ДНК из выборок природных популяций *D. melanogaster* Украины сбора 2007 года  
 М — маркер молекулярного веса (50bp, «Fermentas»), К- — отрицательный контроль, препарат ДНК выборки природной популяции (1 — Одесса, 2 — Лубны, 3 — Пирятин, 4 — Умань, 5 — Варва, 6 — Полесское, 7 — Ялта), К+ — положительный контроль.

Fig. 1. Identification of *Wolbachia* 16S rDNA gene in natural populations of *D. melanogaster* from Ukraine sampled in 2007

М — molecular weight marker (50 bp, “Fermentas”), К- — negative control; genomic DNA from natural populations: 1 — Odesa, 2 — Lubny, 3 — Pyryatyn, 4 — Uman, 5 — Varva, 6 — Poliske, 7 — Yalta, К+ — positive control.

Результаты показали наличие в выборках популяций из всех исследуемых регионов штамма *wMel* (номера некоторых полученных последовательностей в GenBank HM775086, HM775087, HM775088, HM775089, HM775090, HM775091, HM775092). Данный штамм был описан для бактерии, которая инфицирует *D. melanogaster* [15]. Проведение такого анализа было необходимо, поскольку известен вирулентный штамм *popcorn*, инфицирующий лабораторные линии *D. melanogaster* и вызывающий у дрозофил дегенерацию нервных и мышечных тканей [10], что приводит к их ранней гибели. В природных популяциях дрозофилид данный штамм до сих пор идентифицирован не был. Нельзя также исключать возможности наличия в исследуемых популяциях *D. melanogaster* других штаммов бактерии или вариантов штамма *wMel*.

Сравнительный анализ фрагмента гена *wsp* из всех исследованных природных популяций показал 100% идентичность участку гена поверхностного белка *Wolbachia*, а также с таковым из имеющихся в GenBank (FJ403330). Следовательно, так называемый варибельный регион, который считается таковым в силу различий последовательности нуклеотидов у эндосимбионтов разных видов насекомых, не является варибельным в природных популяциях *D. melanogaster* Украины. Таким образом, данный фрагмент гена не может использоваться как маркерная последовательность для сравнения бактерий из разных популяций *D. melanogaster* Украины в силу отсутствия варибельности в пределах их геномов, которые инфицируют данный вид на этой территории.

В результате проведенных исследований идентифицированы внутриклеточные бактерии *Wolbachia* в 35 выборках (из 37 исследованных) природных популяциях *D. melanogaster* Украины, что свидетельствует о значительном распространении этих эндосимбионтов на исследуемой территории. Изученные бактерии относятся к штамму *wMel*. В большинстве случаев инфекция наблюдается в одной и той же популяции *D. melanogaster* из года в год, что свидетельствует о низкой вероятности потери *Wolbachia* во время периода диапаузы.

Автори благодарны проф. Милиневському Г.П., с.н.с. Чижевському І.А., співробітникам біологічного факультета Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, співробітникам Інститута виноградарства і вина «Магарач» за допомогу в зборі дрозофілід, проф. Мюссе Т. за допомогу в сиквенуванні, с.н.с. Ілинському Ю. за обговорення результатів.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Захаров І.К., Ваулін О.В., Ілинський Ю.Ю. і др. Істочники генетическої змінчівості в природних популяціях *Drosophila melanogaster* // Вестник ВОГиС. — 2008. — Т. 12, № 1. — С. 112–126.
2. Ілинський Ю.Ю., Захаров І.К. Ендосимбіонт *Wolbachia* в Євразійських популяціях *Drosophila melanogaster* // Генетика. — 2007. — Т. 43, № 7. — С. 905–915.
3. Проценко А.В., Жук О.В., Козерецька І.А. Соотношения полов в природних популяціях *Drosophila melanogaster* України // Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. — 2006. — Т. 4. — № 2. — С. 193–199.
4. Серга С.В., Проценко А.В., Жук О.В., Козерецька І.А. *Wolbachia* sp. І соотношение полов в природних популяціях *Drosophila melanogaster* України // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Зб. наук. пр./ Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова. — К.: Логос, 2007. — Т. 1. — С. 304–308.
5. Altschul S.F., Gish W., Miller W., et al. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. — 1990. — Vol. 215. — P. 403–410.
6. Білоусов О.О., Колодочка Л.О., Заблудовська С.О., Козерецька І.А. Горизонтальне перенесення внутрішньоклітинних бактерій роду *Wolbachia* від коменсальних кліщів *Tyrophagus putrescentiae* до *Drosophila melanogaster* // Доповіді Національної академії наук України. — 2011. — № 4. — С. 139–142.
7. Hoffmann A.A., Hercus M., Dagher H. Population dynamics of the *Wolbachia* infection causing cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster* // Genetics. — 1998. — Vol. 148, № 1. — P. 221–231.





8. Houck M.A., Clark J.B., Peterson K.R., Kidwell M.G. Possible horizontal transfer of *Drosophila* genes by the mite *Proctolaelaps regalis* // Science. — 1991. — Vol. 253, № 5024. — P. 1125–1128.

9. Mateos M., Castrezana S.J., Nankivell B.J., Estes A.M., Markow T.A., Moran N.A. Heritable Endosymbionts of *Drosophila* // Genetics. — 2006. — Vol. 174, № 1. — P. 363–376.

10. Min K.-T., Benzer S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — Vol. 94. — P. 10792–10796.

11. Teixeira L., Ferreira A., Ashburner M. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster* // PLoS Biol. — 2008. — Vol. 6, № 12. — e1000002. doi:10.1371/journal.pbio.1000002.

12. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Research. — 1994. — Vol. 22. — № 22. — P. 4673–4680.

13. O'Neill S.L., Giordano R., Colbert A.M.E., Karr T.L., Robertson H.M. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1992. — Vol. 89. — P. 2699–2702.

14. Werren J.H. Biology of *Wolbachia* // Annu. Rev. Entomol. — 1997. — Vol. 42. — P. 587–609

15. Zhou W., Rousset F., O'Neil S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences // Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences. — 1998. — Vol. 265. — P. 509–515.



С.В. Серга, І.А. Козерецька

Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
вул. Володимирська, 64, 01601, Київ, Україна,  
тел.: +38 (044) 522 39 95, e-mail: luchiksveta05@gmail.com

## **WOLBACHIA В ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER* УКРАЇНИ**

### **Реферат**

Проведено виявлення та ідентифікацію бактерій роду *Wolbachia* в природних популяціях *Drosophila melanogaster* України методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням специфічних праймерів до фрагментів генів 16S рРНК та *wsp* з подальшим аналізом прочитаної послідовності. Наявність бактерій встановлено в 14 природних популяціях *D. melanogaster* України і належать вони до штаму *wMel*.

Ключові слова: *Wolbachia*, ендосимбіонт, *Drosophila melanogaster*, ген 16S рРНК, ген *wsp*.

S.V. Serga, I.A. Kozeretska

Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64, Volodymyrska str., Kyiv, 01601, Ukraine, tel.: +38 (044) 522 39 95, e-mail: luchiksveta05@gmail.com

## **WOLBACHIA FROM NATURAL POPULATIONS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* FROM UKRAINE**

### **Summary**

Determination and identification of the intracellular bacterium *Wolbachia* were done for 14 natural populations of *Drosophila melanogaster* from Ukraine in which typing of the bacterium had not been done before. Identification was performed using PCR, and typing was done by aligning the sequences of 16S rRNA and *wsp* gene fragments. Presence of bacteria was determined in all investigated natural populations of *D. melanogaster* from Ukraine. They belong to strain *wMel*.

Key words: *Wolbachia*, endosymbiont, *Drosophila melanogaster*, 16S rRNA gene, the *wsp* gene.

Одержано 27.10.2011.

