

5. Кириллова Н.В. Изменение активности супероксиддисмутазы в каллусной культуре *Rauwolfia serpentina* Benth., выращенной в стандартных условиях и при температурном шоке // Прикл. биохимия и микробиология. – 2004. – **40**, № 1. – С. 89–93.
6. Комов В.П., Троицкая Л.А., Кириллова Н.В. Выделение и очистка пероксидазы из каллусной культуры женьшеня // Прикл. биохимия и микробиология. – 1998. – **34**, № 5. – С. 495–498.
7. Кругова Е.Д., Коць С.Я., Мандровская Н.М., Василюк В.Н. Активность пероксидазы и полифенолоксидазы в клубеньках и корнях сои, инокулированной Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* // Вісник Харківського Національного аграрного університету. Сер. Біологія. – 2008. – Вип. 1(13). – С. 6-14
8. Коробкова К.С., Онищенко А.М., Панченко Л.П., Мамчур О.Є., Дмитрук О.О., Редько В.І. Створення модельної системи in vitro для вивчення взаємодії фітопатогенних молікутів з клітинами рослин мікоплазм // Мікробіол. журн. – 2009. – **71**, № 4. – С. 58–62.
9. Мишина Г.Н., Талиева М.Н. Изучение особенностей окислительного метаболизма возбудителя мучнистой росы флокса при взаимоотношениях с растением-хозяином // Облигатный паразитизм, цитофизиологические аспекты. – М.: Наука, 1991. – С. 65–73.
10. Озерцовская О.Л., Варламов В.П., Васюкова Н.И., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Панина Я.С. Воздействие системных сигнальных молекул на скорость распространения по тканям картофеля иммунизирующего эффекта элиситоров // Прикл. биохимия и микробиология. – 2004. – **40**, № 2. – С. 252–256.
11. Рубин Б.А., Арциховская Е.В., Аксенова В.А. Биохимия и физиология иммунитета растений. – М.: Высш. шк., 1975. – 318 с.
12. Серова З.Я., Подчуфарова Г.М., Гесь Д.К. Окислительно-восстановительные процессы инфицированного растения. – Минск: Наука и техника, 1982. – 230 с.
13. Сюма А.А. Внутрішньовидова мінливість *Cercospora Beticola* Sacc. та вдосконалення методів оцінки стійкості цукрових буряків до церкоспорозу : Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Киев, 2007. – 20 с.
14. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 2002. – С. 53-133.
15. Aguirre J., Rios-Momberg M., Hewitt D., Hansberg W. Reactive oxygen species and development of microbial eukaryotes // Trends in Microbiol. – 2005. – **13**, N 3. – P. 11–118.
16. Lamb C., Dixon R.A. The oxidative burst in plant disease resistance // Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. – 1997. – **48**. – P. 251–257.
17. Patsonkis N., Georgion C.D. Determination of the thiol redox state of organisms: new oxidative stress indicators // Anal. Bioanal. Chem. – 2004. – **378**, N 7. – P. 1783–1792.
18. Temple M., Perrone G., Dawes I. Complex cellular responses to reactive oxygen species // Trends in Cell Biol. – 2005. – **15**, N 6. – P. 31–326.

Отримано 29.04.2010

УДК 579.262

Белусов А.О., Козерецкая И.А.

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, кафедра общей и молекулярной генетики, ул. Владимирская 64, Киев, 01033, Украина

СИМБИОТИЧЕСКИЕ БАКТЕРИИ, МОДИФИЦИРУЮЩИЕ ПРОЦЕССЫ РЕПРОДУКЦИИ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

*Последнее десятилетие во всем мире активно изучаются цитоплазматические бактерио-симбионты, масштабы их распространения в природных и лабораторных популяциях хозяев; пути и способы их передачи в пределах одного вида и между филогенетически далекими видами; природа и механизмы их взаимодействия как между собой, так и со своими хозяевами; их эволюция и коэволюция. В любом исследовании особое место занимают модельные организмы, к коим, без сомнения, относится и *Drosophila melanogaster*. Среди эндосимбиотических бактерий плодовой мушки достаточно широко исследовались в последнее десятилетие только представители родов *Wolbachia*, *Cardinium* и *Spiroplasma*. Анализу этих работ и посвящен данный обзор.*

Ключевые слова: *Wolbachia*, *Spiroplasma*, *Cardinium*, эндосимбиотические бактерии, *Drosophila melanogaster*, фенотипические эффекты.

Бактерии-эндосимбионты всё больше и всё настойчивее привлекают внимание ученых различных специальностей по всему миру. Наибольший интерес представляют бактерии родов *Wolbachia*, *Cardinium* и *Spiroplasma*. Уже сейчас они поражают воображение своей не-

© Белусов А.О., Козерецкая И.А. 2011

обычайно широкой распространенностью среди беспозвоночных, в особенности членистоногих, и тем разнообразием фенотипических эффектов, которые они способны вызывать у колонизируемых ими организмов (начиная от модификаций полового размножения [2, 3, 5], и заканчивая дегенерацией тканей [28, 41]). Более того, благодаря недавним исследованиям был установлен факт встраивания генетического материала *Wolbachia* в геном хозяина [26, 15], что свидетельствует о существовании горизонтального переноса генетической информации в системе симбионт-хозяин.

Внутриклеточные бактерии указанных выше родов были найдены у пауков, ногохвосток, клещей, ракообразных, насекомых родов *Coleoptera*, *Orthoptera*, *Lepidoptera*, *Dyctioptera*, *Diptera*, *Hymenoptera* и других [7, 45, 50, 3, 5]; и даже у нематод, где они настолько «породнились» со своим хозяином, что избавление их от бактериальной инфекции зачастую является причиной летального исхода, что, в свою очередь, активно используется в антифилярической терапии [17]. По различным данным, одной только вольбахией инфицировано от 20 % до 75 % всех исследованных видов насекомых [2, 3, 5]. Однако, после математической обработки собранных данных, речь уже идет о 66 % [25]. Следует также отметить, что список организмов, у которых были найдены эндосимбиотические бактерии перечисленных родов, довольно быстро пополняется.

В любом исследовании особое место отводится модельным организмам, к коим, без сомнения, относится и *Drosophila melanogaster*. Среди эндосимбиотических бактерий плодовой мушки достаточно широко исследовались в последнее десятилетие только представители родов *Wolbachia*, *Cardinium* и *Spiroplasma*. Анализу этих работ и посвящен данный обзор.

Эндосимбиотические бактерии родов *Wolbachia*, *Cardinium* и *Spiroplasma*

Вольбахия была открыта в 1924 году Хертигом (Hertig) и Вольбахом (Wolbach) [2]. Также как и предки митохондрий, представители рода *Wolbachia* относятся к облигатным α -протеобактериям [4, 5, 37]. Вольбахия – это граммнегативная аэробная неподвижная бактерия. Её клетки диморфны; это либо очень малые (диаметр 0,25–0,5 мкм), либо довольно большие (диаметр 0,5–1,8 мкм) кокоидные или неправильные палочкоподобные формы (длина 0,5–1,3 мкм) [2]. В клетке бактерия окружена двойной мембранной. Внутренняя принадлежит самой вольбахии, а наружная является продуктом клетки хозяина [4, 5]. Присутствует бактерия как в соматических тканях, так и в клетках зародышего пути. Интересно, что инфицированные и неинфицированные клетки располагаются мозаично, прилегая одна к другой. Такое расположение особенно характерно для жировых тел [14].

Вольбахия передается преимущественно трансовариально. Проникая в цитоплазму яйцеклетки и инфицируя таким способом потомков, этот бактериальный эндосимбионт передается из поколения в поколение. Передача же бактерии сперматозоидами не была продемонстрирована, что вероятно связано с малыми размерами последних [2, 5, 37]. В то же время вольбахия присутствует в сперматоцитах и сперматидях. Также известно, что зрелые мужские половые клетки участвуют в механизме цитоплазматической несовместимости [40, 37].

Горизонтальная передача бактериальной инфекции (без участия половых клеток) характерна в основном для ассоциаций, где донор и реципиент пребывают в тесном контакте (например, паразитическая оса *Leptopillina bouleari* и *D.simulans*) [35, 39, 22, 24]. В то же время горизонтальная передача вольбахии между видами-комменсалами также вполне вероятна [12, 13]; уже не говоря о горизонтальном переносе бактериальной инфекции полунатуральным путем [32] или с помощью микроинъекций [10, 11, 18].

Со своими хозяевами у данной бактерии в процессе их сосуществования сложились различные взаимоотношения, начиная от паразитизма и заканчивая мутуализмом (с теми же филлярическими нематодами, например). Вольбахия с завидной ловкостью научилась, используя различные молекулярные механизмы, регулировать развитие и размножение своего хозяина. Наверно именно поэтому ее называют «бактерией-манипулятором» или «репродуктивным паразитом» [5]. Более того, вольбахия может быть одним из факторов так называемого «инфекционного видообразования» [43, 2, 3].

Для достижения своих целей, а именно увеличения количества собственных потомков в популяциях хозяев, в своем арсенале бактерия имеет ряд репродуктивных манипуляций, таких как цитоплазматическая несовместимость, феминизация, партеногенез, андроцид и

другие [2, 3, 5]. Также известны довольно необычные фенотипические эффекты. Например, штамм *popcorn*, найденный у *D. melanogaster*, вызывает дегенерацию тканей взрослых особей, что в итоге приводит к их гибели [28, 41]. Следует также отметить, что бактерии рода *Wolbachia* способны репрессировать пути апоптоза клеток зародышевого пути хозяина, а также мутации, вызывающие стерильность [37]. Таким образом, можно говорить о многогранности взаимодействия эндосимбионта с хозяином, которое определяется как особенностями биологии самого хозяина, так и штаммом бактерии [3].

Интересным является также тот факт, что вольбахия некоторое время может существовать вне клетки без утраты своей жизнеспособности и вирулентности, что может быть одним из возможных путей ее горизонтальной передачи, и, как следствие, одной из причин такого широкого распространения в мире беспозвоночных [33].

Представители рода *Cardinium* были открыты и описаны сравнительно недавно [48, 49]. До их окончательного определения, этих эндосимбионтов относили к *Encarsia*-бактериям (EB) [48], *Cytophaga*–*Flavobacterium*–*Bacteroides* (CFB) [45, 50] и *Cytophaga*-подобным организмам (CLO) [45, 23]. К наружным структурам бактерии принадлежат плазматическая мембрана и клеточная стенка. У многих бактерий были также обнаружены уникальные палочкоподобные [45] или микрофиламентные структуры, которые были прикреплены к плазматической мембране. Наблюдались они только в одной из дочерних клеток, которые образовались в результате митотического деления, что свидетельствует о невозможности их наследования сразу обеими клетками [48, 49].

С помощью электронной микроскопии огромное количество бактерий было обнаружено почти во всех типах клеток, включая питательные клетки и ооциты, что может служить признаком вертикальной (трансовариальной) передачи данного эндосимбионта [45].

Так как представители рода *Cardinium* были описаны только недавно, реально оценить масштабы их распространения довольно сложно. На данный момент достоверно известно, что 6–7 % исследованных видов членистоногих инфицированы этой бактерией [45, 50]. Наличие кардиниума было установлено у 16 видов из 5 рядов, среди которых *Oribatida*, *Prostigmata*, *Mesostigmata*, *Hymenoptera* и *Hemiptera*. Наивысший уровень инфицированности был у арахнид – 31,6 %. Кроме того, бактерия была обнаружена у некоторых нематод. Но тут следует отметить, что для выявления представителей рода *Cardinium*, использовались праймеры, которые базировались всего лишь на трех известных 16S рДНК последовательностях CLO. Поэтому реальное распространение этого эндосимбионта еще только предстоит выяснить [45]. Согласно сравнительно недавним исследованиям, попытки установить их наличие у *D. melanogaster* не увенчались успехом [45, 50].

Интересным есть тот факт, что подобные последовательности 16S рДНК кардиниума были обнаружены у эволюционно далеких видов насекомых и клещей, при этом их сходство могло достигать порядка 96–98 % [21]. Одним из объяснений этому явлению может быть горизонтальная передача эндосимбионта [50].

Хотя представители рода *Cardinium* не являются родственными представителям рода *Wolbachia*, для достижения собственных целей они способны использовать те же репродуктивные манипуляции, что и последние. Так, это может быть партеногенез, феминизация, цитоплазматическая несовместимость и повышение плодовитости [48, 23, 44, 49, 46]. Кроме того, известно, что в природных популяциях беспозвоночных, которые характеризуются указанными модификациями размножения, представителей рода *Cardinium* нередко обнаруживают вместе с бактериями рода *Wolbachia*, но все еще остается невыясненным, действуют ли они сообща или независимо друг от друга [45, 50, 21].

Род *Spiroplasma* был открыт сравнительно недавно. *Spiroplasma citri*, этиологический возбудитель «Stubborn» заболевания цитрусовых, был первым описанным видом этого рода [34]. Бактерии рода *Spiroplasma* принадлежат к граммнегативным анаэробным и спиралеобразным, способным к вращательному и винтообразному движению прокариотам, которые не имеют клеточной стенки [19]. Размножение происходит за счет образования в нитях кокоподобных структур – элементарных телец; обнаружено также бинарное деление и почкование. Спироплазма – стеринзависимая бактерия [6]. Передается вертикально [7]. Титр бактерий

особенно высок в гемолимфе взрослых особей, в то время как в жировых телах, грудных мышцах, яичниках и личиночной гемолимфе он незначителен [7, 8].

Хозяевами этого эндосимбионта являются насекомые, в том числе и дрозофилиды, несколько реже – растения и клещи [42, 7, 19, 8, 27]. Что касается фенотипических проявлений бактериальной инфекции у дрозофилид, то некоторые штаммы *Spiroplasma poulsonii* способны вызывать андроксид и отклонения от нормального соотношения полов у своего хозяина [7, 19, 8 27].

Вольбахия и *D.melanogaster*

Представители рода *Wolbachia* широко распространены как в природных популяциях, так и в лабораторных линиях *D.melanogaster* по всему миру. Согласно недавним исследованиям: 1) общий процент инфицированных линий *D. melanogaster* дикого типа, находящихся в коллекции BDSC (Bloomington *Drosophila* Stock Center), практически идентичен таковому в целом по всем линиям BDSC (24 % и 29 % соответственно); 2) уровень инфицированности вольбахией варьирует от 10 до 45 % в линиях дрозофил, в зависимости от того, какими классами генетических повреждений они характеризуются; 3) уровень инфицированности также зависит от того, в какой именно хромосоме наблюдается то или иное генетическое нарушение. Например, у 60 % тестированных линий, несущих X-сцепленные летальные мутации, была обнаружена вольбахия, в несущих мутации во второй и третьей хромосомах, только в 16 %; 4) уровень инфицированности может зависеть также от типа линии. Так, линии, несущие X-сцепленные летали, характеризуются уровнем инфицирования в 60 %, X-сцепленные балансеры – 40 %, а линии с делециями в X хромосоме – 12 %. Похожая картина характерна также для линий с P-цитотипом [14].

У *D. melanogaster* вольбахия является причиной такого фенотипического эффекта, как цитоплазматическая несовместимость – ранней смертности яиц, полученных в результате спаривания инфицированного самца со «здоровой» самкой, либо с самкой, инфицированной другим штаммом *Wolbachia*. Механизм цитоплазматической несовместимости до сих пор остается изученным недостаточно, и до сих пор многие детали головоломки остаются ненайденными. Однако на данный момент все же известны некоторые процессы, происходящие в сперматогенезе и эмбриогенезе, следствием которых, вероятно, является цитоплазматическая несовместимость. Так, например, у инфицированных самцов формирующаяся сперма имеет ряд отклонений от нормы: разориентированные аксонемы, две аксонемы на сперматиду, нарушение конденсации хромосом и прочее [37]. Известно, что зрелые мужские половые клетки не несут самой бактерии, однако, вероятно, она осуществляет некий «импринтинг» спермы, который возможен или за счет присоединения к ней секретлируемых вольбахией продуктов, приводящих к нарушению конденсации хроматина, или же за счет модификации, либо устранения нормальных составляющих спермы в процессе ее созревания [2]. На ранних же стадиях эмбриогенеза наблюдается задержка разрушения ядерной мембраны мужского пронуклеуса и нарушение веретена деления, как следствия элиминации отцовских хромосом; происходят асинхронные деления и появляются хроматиновые мосты между ядрами, а также другие дефекты, которые аккумулируются в результате последующих митотических делений (нарушения сегрегации хромосом), вызывая в конечном итоге смерть эмбрионов.

И все же цитоплазматическая несовместимость, косвенно дает преимущество инфицированным самкам над неинфицированными, и позволяет вольбахии распространяться в популяциях *D.melanogaster*. Это преимущество осуществляется благодаря способности инфицированных самок «спасать» сперму инфицированного самца, и избегать описанных выше катастрофических процессов. Такой механизм известен также, как mod-resc (modification-rescue) [2, 3, 5, 37].

Что удивительно, у *D.melanogaster* наблюдается довольно низкий уровень цитоплазматической несовместимости: он слабее в сравнении с таковым у *D. simulans*, вызванной близкородственными штаммами *Wolbachia*. Несмотря на это, вольбахия распространилась в популяциях *D.melanogaster* всех континентов. Такое широкое распространение, возможно, отражает древнюю историческую связь между *D. melanogaster* и вольбахией, которая существовала с момента выхода дрозофилы из Африки и до ее современного географического распространения. Однако, наблюдаемый слабый и переменный уровень цитоплазматической несовмес-

тимости у *D. melanogaster*, и такое широкое преобладание представителей рода *Wolbachia* среди популяций *D. melanogaster*, натолкнуло на предположение, что, вероятно, вольбахия дает некие преимущества самкам дрозофилы, что в свою очередь дает ей возможность колонизировать популяции хозяина с большим успехом [16].

Было показано, что цитоплазматическая несовместимость может быть очень существенна в скрещиваниях неинфицированных (или инфицированных иным штаммом *Wolbachia*) самок *D. melanogaster* с молодыми инфицированными самцами, и с возрастом снижаться. Объяснением этому явлению может быть тот факт, что самцы в основном спариваются в 1–2 дневном возрасте [16].

Однако при спаривании неинфицированных самок даже с молодыми инфицированными самцами уровень цитоплазматической несовместимости может быть низким. Такая вариативность этого фенотипического эффекта в популяциях *D. melanogaster*, вероятно, может быть объяснена ее зависимостью от времени развития самцов: чем быстрее идет их развитие, тем сильнее проявляется цитоплазматическая несовместимость. Однако это никак не коррелировало с титром бактерий в тканях инфицированных самцов, следовательно, взаимодействия между эндосимбионтом и хозяином, вероятно, характеризуются более сложным механизмом [47].

Интересные результаты были получены при скрещивании линии *Canton-S*, которая не имела ни Р-элемента, ни вольбахии, с линией *Harwich*, которая была инфицирована вольбахией и имела этот мобильный элемент. Так, при скрещивании этих двух линий (самки *Canton-S* х самцы *Harwich*) наблюдалась цитоплазматическая несовместимость и гибридный дисгенез у потомков. При реципрокном (обратном) скрещивании этих линий ничего подобного не наблюдалось. Самцы, полученные в результате этого скрещивания, однако, были инфицированы вольбахией, и при последующих скрещиваниях с незараженными самками могла наблюдаться цитоплазматическая несовместимость. До сих пор неизвестно, какой эффект, если таковой вообще есть, имеет вольбахия на активность Р-элемента, или какой эффект имеет Р-элемент (или другие мобильные генетические элементы) на вольбахию, однако потенциально это может быть как геномный конфликт, так и кооперация между этими двумя агентами [14].

Еще один довольно необычный фенотипический эффект был обнаружен Мином (Min) и Бензером (Benzer) в процессе поиска мутаций, которые бы вызывали дегенерацию тканей головного мозга. Обнаруженный при этом штамм вольбахии (*popcorn*), который кроме тканей мозга, активно размножается и в других тканях взрослых особей *D. melanogaster*, таких как сетчатка, грудные мышцы и яичники, вызывал тем самым преждевременную смерть инфицированных особей [28, 41].

Результаты недавних исследований показали, что вольбахия может иметь существенное влияние на дрозофил с мутантным фенотипом, хотя точная природа таких взаимодействий до сих пор не ясна. Так, в популяциях *D. melanogaster*, которые несут в своем геноме ген *chico*, представленный двумя аллелями *chi¹* и *chi²*, обнаружена *Wolbachia* типа А, устранение которой вызывало смерть у гомозигот по *chi²* и практически не имело никакого эффекта на гомозигот по *chi¹*. Дальнейший анализ показал, что эффект вольбахии не был связан непосредственно с *chico*, а с другим, пока не картированным локусом [14].

Наряду с этим имеются данные, согласно которым бактерии рода *Wolbachia* возобновляют фертильность мутантных самок *D. melanogaster*, которые не способны формировать и откладывать яйца из-за повреждений гена *Sxl* (*Sex-lethal*), основного регулятора определения пола. Что интересно, супрессия стерильности значительно различается между аллелями *Sxl*, и не наблюдается при мутациях, которые имеют подобные фенотипы «опухолового яичника» ('tumorous ovary'), однако расположены в других генах, включая тот, который блокирует экспрессию *Sxl* в клетках зародышевого пути. Такая аллеле- и геноспецифичность указывает на то, что, вероятно, супрессия стерильности является результатом специфического взаимодействия с *Sxl* протеином, нежели избеганием нормальной потребности этого регулятора развития или эффектом на экспрессию *Sxl* [36].

Так как бактериальные эндосимбионты, к коим относится и вольбахия, в большинстве случаев передаются по материнской линии, природный отбор отдает предпочтение тем внутриклеточным симбионтам, которые повышают приспособленность (жизнеспособность или

плодовитость) самок вида-хозяина. Так, согласно результатам недавних исследований, инфицированные самки обладают значительно большей продолжительностью жизни и конкурентоспособностью по сравнению с самками того же генотипа, но без вольбахии. Скорость нарастания процессов старения и гибели с возрастом у первых была также ниже, чем у вторых [1]. Однако ранее было показано, что влияние вольбахии на продолжительность жизни как самок, так и самцов *D. melanogaster* может быть не только положительным. Так, инфицированные мушки лабораторной линии W19 живут на 12 % меньше, в сравнении с неинфицированными дрозofiлами той же линии [16].

В дополнение, также было описано увеличение плодовитости у инфицированных вольбахией африканских и американских популяций *D. melanogaster*, и что более интересно, ее уровень был наивысшим при спаривании инфицированных самок с неинфицированными самцами, что, видимо, позволяет вольбахии с большим успехом распространиться в той популяции, где она еще редка [16].

Совсем недавно было продемонстрировано, что вольбахия обеспечивает *D. melanogaster* большую устойчивость к *Drosophila C* вирусу. Более того, данная бактерия также повышает резистентность дрозофил и к двум другим РНК-вирусным инфекциям (Noga вирус и Flock House вирус). В тоже время повышения устойчивости *D. melanogaster* к ДНК-вирусным инфекциям (например, Insect Iridescent вирус 6) не наблюдалось. Однако все еще остается неизвестным, какие именно механизмы лежат в основе такого фенотипического эффекта. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ответ организма на действие различных патогенов может зависеть от разных факторов, в том числе и от наличия эндосимбионтов. Индуцированная устойчивость к природным вирусным патогенам может быть еще одним объяснением такого широкого распространения вольбахии в природных популяциях [38].

Спироплазма и *D.melanogaster*

Что касается эндосимбиотических бактерий рода *Spiroplasma*, то представление об их реальной распространенности в популяциях *D.melanogaster* еще довольно туманно и требует дальнейших исследований. Но уже сейчас есть данные, что спироплазмой инфицированы около 2,3 % видов дрозофил, собранных в Ресифе (Recife), Бразилия [29], а также дрозофилы, собранные в Уганде, Африка, у которых она вызывала андроцид, фенотипический эффект, выражающийся в избирательной смертности самцов, в результате которого наблюдается сдвиг соотношения полов в сторону преобладания самок [31]. Эмбриологические исследования показали, что яйца, из которых должны были развиваться самцы, погибают на ранних стадиях развития перед гастрულიцией. Генетический и мутационный анализы продемонстрировали, что насекомые с мужским кариотипом избирательно погибают, независимо от их фенотипического пола. Предположительно, тканями-мишенями являются примордиальная мезодерма и нервная система мужских эмбрионов. Несмотря на всё это, механизм андроцида до сих пор остается окончательно не изученным [7].

Обнаруженная в бразильских популяциях *D. melanogaster* спироплазма была определена, как *S. poulsonii*, которая также была обнаружена и у дрозофил группы *willistoni*, которые, в свою очередь, обитают вместе с *D. melanogaster*, что, вероятно, может быть объяснено горизонтальной передачей бактериальной инфекции между видами этих двух групп дрозофилид. Предположительно, в роли вектора такого переноса может выступать клещ *Proctolaelaps regalis* [29].

Также, на основании сравнения последовательностей ДНК в трех локусах, обнаруженная у *D.melanogaster* из Уганды спироплазма, очень похожа на спироплазму, обнаруженную в бразильских популяциях *D. melanogaster*. Однако часть одного локуса, кажется, имеет рекомбинантную историю. Такая схожесть последовательностей, вероятно, может быть объяснена выходом дрозофилы из Африки с дальнейшим ее распространением по всему миру, что в свою очередь может свидетельствовать о довольно длительных взаимоотношениях спироплазмы и *D. melanogaster*, чем можно было бы предположить вначале. Кроме этого, у популяции *D.melanogaster* из Уганды наблюдалась зависимость эффективности андроцида и передачи бактериальной инфекции в поколениях от возраста самки: 4–6 недельные – давали практически 100 % самок в следующем поколении, в то время как соотношение полов потомков молодых – имело более умеренный уклон в сторону преобладания самок, либо бак-

териальная инфекция вовсе не передавалась потомкам. Самцы же, полученные от молодых самок, характеризовались пониженной выживаемостью, что предположительно, может быть связано с вредным влиянием на них андрогитарного процесса [31].

В популяциях *D. melanogaster* было обнаружено два штамма спироплазмы, имеющие диаметрально противоположные особенности взаимодействия с организмом хозяина. Первый, названный NSRO (from *nebulosa* sex ratio organism), вызывает андрогид, второй, названный NSRO-A, такого фенотипического эффекта не вызывает. Почему штамм спироплазмы NSRO-A не убивает самцов *D. melanogaster* – неизвестно. Однако существует гипотеза, основанная на исследованиях популяционной динамики NSRO и NSRO-A (с помощью количественной ПЦР – полимеразная цепная реакция) в процессе развития хозяина, согласно которой, предположительно, проявление андрогиды зависит от густоты эндосимбиотических бактерий в тканях на разных стадиях развития хозяина [7]. Интересным является тот факт, что густота и, следовательно, андрогитарный фенотип инфекции зависит от температуры. Так, оптимальной является температура 25 °С, при 18 °С наблюдалось резкое снижение как густоты, так и фенотипического эффекта, а при 28 °С – постепенное их снижение [9].

Множественное инфицирование *D. melanogaster*

В некоторых природных популяциях *D. melanogaster* сравнительно недавно было обнаружено множественное инфицирование: дрозофилы были заражены как вольбахией, которая вызывала цитоплазматическую несовместимость, так и спироплазмой, вызывающей андрогид. Однако на основе сравнения личиночной конкурентоспособности и плодовитости взрослых, неинфицированных и множественно инфицированных самок, никакого ни положительного, ни отрицательного эффекта на приспособленность особей не было обнаружено. Это наталкивает на мысль о, возможно, других преимуществах, которые дает множественное инфицирование, и которые, в свою очередь, дали ему возможность закрепиться в популяциях *D. melanogaster* [30].

Однако наблюдалась некая асимметрия во взаимодействии самих эндосимбионтов. Так титр вольбахии в линиях *D. melanogaster* был выше, чем в линиях, которые были инфицированы обеими бактериями. В тоже время титр спироплазмы был одинаков как в моно-, так и в диинфицированных линиях. Кроме того, в организме хозяина при множественном инфицировании, бактерии имели свой собственный тканевой тропизм: спироплазма локализовалась в яичниках, вольбахия – в мальпигиевых сосудах. Более того, вольбахия не была обнаружена в гемолимфе, принципиальном месте локализации спироплазмы. Вполне вероятно, разные ткани хозяина выступают в роли разделяющих мест обитания для эндосимбионтов, а литические процессы при метаморфозе хозяина могут вовлекаться в формирование асимметрических взаимодействий эндосимбионтов при диинфицировании [20].

Весь вышеуказанный массив данных свидетельствует как о прикладном, так и о функциональном значении исследований внутриклеточных симбиотических микроорганизмов *D. melanogaster*, способных вызывать у этого вида различные фенотипические эффекты. Дальнейшие исследования, несомненно, принесут новые интересные данные об эволюции и коэволюции этих видов.

О.О. Білоусов, І.А. Козерецька

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, кафедра загальної та молекулярної генетики, вул. Володимирська 64, Київ, 01033, Україна

СИМБІОТИЧНІ БАКТЕРІЇ, ЯКІ МОДИФІКУЮТЬ ПРОЦЕСИ РЕПРОДУКЦІЇ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Резюме

Останнє десятиріччя у всьому світі активно вивчаються цитоплазматичні бактерії-симбіонти. Масштаби їх поширення в природних та лабораторних популяціях безхребетних, особливо членистоногих, вражають увагу вчених. Шляхи та способи їх передачі в межах одного виду та між філогенетично далекими видами – різні, і часом можуть виявитись досить неочікуваними, що робить їх дослідження ще більш захоплюючим та цікавішим. Природа та механізми їх взаємодії як між собою, так і зі своїми хазяїнами,

надзвичайно різноманітні. Цитоплазматична несумісність, партеногенез, андроцид, фемінізація, дегенерація тканин та інші – це ті фенотипові ефекти, які внутрішньоклітинні бактерії здатні викликати у своїх хазяїв. Більш того, одна і та ж сама бактерія здатна по-різному впливати на організм та процеси репродукції у різних хазяїв. Таким чином, можна говорити про багатогранність взаємодії ендосимбіонта з хазяїном, яка визначається як біологією його самого, так і бактерії. Однак все ж більшість фенотипічних ефектів направлена на те, щоби бактерії-симбіонти з більшим успіхом колонізували популяції хазяїв шляхом збільшення числа інфікованих самок. На жаль, механізми взаємодії вивчені недостатньо, і часом покриті тайною, завісу якої ще необхідно буде відкрити. Крім того, внутрішньоклітинні бактерії-симбіонти можуть бути одним із факторів так званого «інфекційного видоутворення». У будь-якому дослідженні особливе місце займають модельні організми, до яких, безсумнівно, належить і *Drosophila melanogaster*. Серед ендосимбіотичних бактерій плодової мушки в останнє десятиріччя достатньо широко досліджувались тільки представники родів *Wolbachia*, *Cardinium* та *Spiroplasma*, їх поширення у популяціях *Drosophila melanogaster* усіх континентів, рівень інфікованості і ті фенотипові ефекти, які вони здатні викликати. Аналізу цих робіт і присвячений даний огляд.

Ключові слова: *Wolbachia*, *Spiroplasma*, *Cardinium*, ендосимбіотичні бактерії, *Drosophila melanogaster*, фенотипові ефекти.

A.O.Belousov, I.A.Kozeretskaya

Taras Shevchenko National Kyiv University, Department of General and Molecular Genetics, Kyiv

SYMBIOTIC BACTERIA, WHICH MODIFY REPRODUCTION PROCESSES OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

S u m m a r y

Cytoplasmic bacteria-symbionts are actively investigated all over the world for the last ten years. The scale of their spreading in natural and laboratory populations of invertebrates, especially arthropods, is impressing scientists' imagination. Ways of their intraspecific and interspecific transmission are various. The nature and mechanisms of their interaction both between themselves and with their hosts are extremely diverse. Cytoplasmic incompatibility, parthenogenesis, male-killing, feminization, tissue degeneration and others are those phenotypic effects, which intracellular bacteria can cause in their hosts. Moreover, the same bacterium can have diverse influences on different hosts. So it is possible to talk about many-sidedness of endosymbiont interaction with a host, which is determined both by bacterium and host biology. However, majority of phenotypic effects is directed to the successful colonization of hosts' populations by increasing the number of infected females. Alas, the mechanisms of interaction are still not enough investigated. Besides, intracellular bacteria-symbionts can be one of the factors of the so-called "infectious species formation". In any investigation, model organisms, *Drosophila melanogaster* belonging to them, take a special place. Among drosophila's endosymbionts, only bacteria from genera *Wolbachia*, *Spiroplasma* and *Cardinium* were broadly investigated: their spreading in *Drosophila melanogaster* populations all over the world, the infecting level and those phenotypic effects, which they can cause. So this review is dedicated to analysis of these studies.

The paper is presented in Russian.

К е у о р д s: *Wolbachia*, *Spiroplasma*, *Cardinium*, endosymbiotic bacteria, *Drosophila melanogaster*, phenotypic effects.

The a u t h o r's a d d r e s s: *Belousov A.O.*, Taras Shevchenko Kyiv National University, Dept of General and Molecular Genetics; 64 Volodymyrska St., Kyiv, 01033, Ukraine.

1. Александров И.Д., Александрова М.В., Горячева И.И., Рощина Н.В., Шайкевич Е.В., Захаров И.А. Удаление эндосимбионта *Wolbachia* специфически снижает конкурентоспособность и продолжительность жизни самок, и конкурентоспособность мух линии *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 2007. – **43**, № 10. – С. 1372–1378.
2. Горячева И.И. Бактерии рода *Wolbachia* – репродуктивные паразиты членистоногих // Успехи современной биологии. – 2004 г. – **124**, № 3. – С. 246–259.
3. Марков А.В., Захаров-Гезехус И.А. Бактерия вольбахия – повелитель мух 2004 г. <http://macroevolution.narod.ru/wolbachia.htm>

4. Марков А.В., Куликов А.М., Захаров-Гезехус И.А. Вольбахия и проблема происхождения эвкариот. Специальное дополнение №2 к обзору „Бактерия вольбахия – повелитель мух” 2004 г. http://macroevolution.narod.ru/wolb_eukar.htm
5. Марков А.В., Захаров И.А. Паразитическая бактерия *Wolbachia* и проблема происхождения эвкариотической клетки // Палеонтол. журн. – 2006 г. – № 1. – С. 1–11.
6. Сергийчук М.Г., Позур В.К., Винников А.Н., Фурзікова Т.М., Жданова Н.М., Домбровська І.В., Швець Ю.В. Мікробіологія – Київ: ВПЦ „Київський університет”, 2005. – 375 с.
7. Anbutsu H., Fukatsu T. Population Dynamics of Male-Killing and Non-Male-Killing Spiroplasmas in *Drosophila melanogaster* // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. – **69**, N 3. – P. 1428-1434.
8. Anbutsu H., Fukatsu T. Tissue-specific infection dynamics of male-killing and nonmale-killing spiroplasmas in *Drosophila melanogaster* // FEMS Microbiol. Ecol. – 2006. – **57**, N 1. – P. 40-46.
9. Anbutsu H., Goto S. and Fukatsu T. High and low temperatures differently affect infection density and vertical transmission of male-killing *Spiroplasma* symbionts in *Drosophila* hosts // Applied and Environmental Microbiology. – 2008. – **74**, N 19. – P. 6053-6059.
10. Boyle L., O'Neill S.L., Robertson H.M., Karr T.L. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila* // Science. – 1993. – **260**. – P. 1796-1799.
11. Braig H.R., Guzman H., Tesh R.B., O'Neill, S.L. Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart // Nature. – 1994. – **367**. – P. 453-455.
12. Bilousov O., Kozeretka I. Intracellular symbiotic bacteria (endosymbionts) of commensal mites found in laboratory strains of *Drosophila melanogaster* // Symp. “Genetics – understanding living systems. XX International Congress of Genetics”: Proc. (Berlin, Germany, 12–17 July 2008). – Berlin, 2008. – P.253
13. Bilousov O., Kolodochka L., Zabludovska S., Kozeretka I. Horizontal transmission incidents of *Wolbachia* sp. between *Drosophila melanogaster* and commensal mites *Tyrophagus noxius* // Symp. “EDRC2009. 21st European *Drosophila* Research Conference”: Proc. (Nice Acropolis, France, 18–21 November 2009). – Nice, 2009. – P.82.
14. Clark M.E., Anderson C.L., Cande J. and Karr T.L. Widespread Prevalence of *Wolbachia* in Laboratory Stocks and the Implications for *Drosophila* Research // Genetics. – 2005. – **170**, N 4. – P. 1667-1675.
15. Dunning Hotopp J.C., Clark M.E., Oliveira D.C.S.G., Foster J.M., Fischer P., Munoz Torres M.C., Giebel J.D., Kumar N., Ishmael N., Wang S., Ingram J., Nene R.V., Shepard J., Tomkins J., Richards S., Spiro D.J., Ghedin E., Slatko B.E., Tettelin H., Werren J.H. Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes // Science. – 2007. – **317**. – P. 1753-1755.
16. Fry A.J., Palmer M.R. and Rand D.M. Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster* // Heredity. – 2004. – **93**. – P. 379-389.
17. Fenn K., Conlon C., Jones M., Quail M.A., Holroyd N.E., Parkhill J., Blaxter M. Phylogenetic Relationships of the *Wolbachia* of Nematodes and Arthropods // PLoS Pathog. – 2006 – **2**, N 10. – P. 0887-0899.
18. Grenier S., Pintureau B., Heddi A., Lassablie`re F., Jager C., Louis C., Khatchadourian C. Successful horizontal transfer of *Wolbachia* symbionts between *Trichogramma* wasps // Proc. R. Soc. Lond. – 1998. – **265**. – P. 1441-1445.
19. Gasparich G.E., Whitcomb R.F., Dodge D., French F.E., Glass J., Williamson D.L. The genus *Spiroplasma* and its non-helical descendants: phylogenetic classification, correlation with phenotype and roots of the *Mycoplasma mycoides* clade // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – **54**. – P. 893-918.
20. Goto S., Anbutsu H. and Fukatsu T. Asymmetrical Interactions between *Wolbachia* and *Spiroplasma* Endosymbionts Coexisting in the Same Insect Host // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – **72**, N 7. – P. 4805-4810.
21. Gotoh T., Noda H., Ito S. *Cardinium* symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites // Heredity. – 2007. – **98**. – P. 13-20.
22. Heath B.D., Butcher R.D.J., Whitfield W.G. F., Hubbard S.F. Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism // Current Biology. – 1999. – **9**, N 6. – P. 313-316.
23. Hunter M.S., Perlman S.J., Kelly S.E. A bacterial symbiont in the *Bacteroidetes* induces cytoplasmic incompatibility in the parasitoid wasp *Encarsia pergandiella* // Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 2003. – **270**. – P. 2185-2190.
24. Huigens M.E., de Almeida R.P., Boons P.A., Luck R.F., Stouthamer R. Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps // Proc. Biol. Sci. – 2004. – **271**, N 1538. – P. 509-515.
25. 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. – **281**. – P. 215-220.
26. Kondo N., Nikoh N., Ijichi N., Shimada M. and Fukatsu T. Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2002. – **99**, N 22. – P. 14280-14285.

27. Kageyama D., Anbutsu H., Watada M., Hosokawa T., Shimada M. and Fukatsu T. Prevalence of a Non-Male-Killing Spiroplasma in Natural Populations of *Drosophila hydei* // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – **72**, N 10. – P. 6667-6673.
28. Min K.-T., Benzer S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1997. – **94**, N 20. – P. 10792-10796.
29. Montenegro H., Solferini V.N., Klaczko L.B. and Hurst G.D.D. Male-killing *Spiroplasma* naturally infecting *Drosophila melanogaster* // Insect Molecular Biology. – 2005. – **14**, N 3. – P. 281-287.
30. Montenegro H., Petherwick A.S., Hurst G.D. and Klaczko L.B. Fitness effects of *Wolbachia* and *Spiroplasma* in *Drosophila melanogaster* // Genetica. – 2006. – **127**. – P. 207-215.
31. 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. – **97**, N 1. – P. 27-32.
32. Rigaud T. & Juchault P. Success and failure of horizontal transfer of feminizing *Wolbachia* endosymbionts in woodlice // J. Evol. Biol. – 1995. – **8**. – P. 249-255.
33. Rasgon J.L., Gamston C.E., Ren X. Survival of *Wolbachia pipientis* in Cell-Free Medium // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – **72**, N 11. – P. 6934-6937.
34. Saglio P., Lhospital M., Lafèche D., Dupont G., Bové J.M., Tully J.G., Freundt E.A. *Spiroplasma citri* gen. and sp. n.: a mycoplasma-like organism associated with “stubborn” disease of citrus // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1973. – **23**. – P. 191-204.
35. Schilthuisen M., Stouthamer R. Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing microbes in *Trichogramma* wasps // Proc. Biol. Sci. – 1997. – **264**, N 1380. – P. 361-366.
36. Starr D.J. & Cline T.W. A host–parasite interaction rescues *Drosophila* oogenesis defects // Nature. – 2002. – **418**. – P. 76-79.
37. Serbus L.R., Casper-Lindley C., Landmann F. and Sullivan W. The Genetics and Cell Biology of *Wolbachia*-Host Interactions // Annu. Rev. Genet. – 2008. – **42**. – P. 683-707.
38. Teixeira L., Ferreira A., Ashburner M. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster* // PLoS Biol. – 2008. – **6**, N 12. – P. 2753-2763.
39. Vavre F., Fleury F., Lepetit D., Fouillet P., Bouletreau M. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations // Mol. Biol. Evol. – 1999. – **16**, N 12. – P. 1711-1723.
40. Veneti Z., Clark M.E., Zabalou S., Karr T.L., Savakis C. and Bourtzis K. Cytoplasmic Incompatibility and Sperm Cyst Infection in Different *Drosophila*-*Wolbachia* Associations // Genetics. – 2003. – **164**. – P. 545-552.
41. Werren J. H. *Wolbachia* run amok // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1997. – **94**, N 2. – P. 11154-11155.
42. Williamson D L., Whitcomb R.F., Tully J.G., Gasparich G.E., Rose D.L., Carle P., Bove J.M., Hackett K.J., Adams J.R., Henegar R.B., Konai M., Chastel C. and French F.E. Revised group classification of the genus *Spiroplasma* // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1998. – **48**. – P. 1-12.
43. Wade M.J. Infectious speciation // Nature. – 2001. – **409**, N 6821. – P. 675-677.
44. Weeks A.R., Marec F., Breeuwer J.A.J. A mite species that consists entirely of haploid females // Science. – 2001. – **292**. – P. 2479-2482.
45. Weeks A.R., Velten R., Stouthamer R. Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods // Proc. R. Soc. Lond. B. – 2003. – **270**. – P. 1857-1865.
46. Weeks A.R., Stouthamer R. Increased fecundity associated with infection by a Cytophaga – like intracellular bacterium in the predatory mite, *Metaseiulus occidentalis* // Proc. R. Soc. Lond. B. – 2004. – **271**. – P. S193-S195.
47. Yamada R., Floate K.D., Riegler M. and O’Neil S.L. Male development time influences the strength of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility expression in *Drosophila melanogaster* // Genetics. – 2007. – **177**. – P. 801-808.
48. Zchori-Fein E., Gottlieb Y., Kelly S.E., Brown J.K., Wilson J.M., Karr T.L., Hunter M.S. A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2001. – **98**, N 22. – P. 12555-12560.
49. Zchori-Fein E., Perlman S.J., Kelly S.E., Katzir N., Hunter M.S. Characterization of a ‘*Bacteroidetes*’ symbiont in *Encarsia* wasps (Hymenoptera: Aphelinidae): proposal of ‘*Candidatus Cardinium hertigii*’ // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – **54**. – P. 961-968.
50. Zchori-Fein E., Perlman S.J. Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods // Molecular Ecology. – 2004. – **13**. – P. 2009-2016.

Отримано 30.05.2010