



УДК 577.391:576.312.33

© 2011

О. О. Білоусов, Л. О. Колодочка, С. О. Заблудовська,
І. А. Козерецька

Горизонтальне перенесення внутрішньоклітинних бактерій роду *Wolbachia* від коменсальних кліщів *Tyrophagus putrescentiae* до *Drosophila melanogaster*

(Представлено членом-кореспондентом НАН України В. А. Кунахом)

Ендосимбіотичні бактерії, особливо внутрішньоклітинні види родів Wolbachia та Cardinium, відіграють важливу роль у популяціях їх хазяїв, впливаючи на співвідношення статей останніх. Проте причини їх широкого розповсюдження серед комах досі мало вивчені, оскільки основним способом їх поширення є вертикальне перенесення від батьків до потомства. Вперше показано, що подібне перенесення також можливе у системах з коменсалами.

Внутрішньоклітинні ендосимбіотичні бактерії родів *Wolbachia* та *Cardinium* і позаклітинні бактерії роду *Spiroplasma* досить широко поширені серед безхребетних тварин. Вони спричиняють зміни в співвідношенні статей хазяїв за допомогою таких репродуктивних маніпуляцій, як партеногенез, фемінізація та цитоплазматична несумісність [1–3]. Причини такого розповсюдження досі не відомі, оскільки основним шляхом поширення цих бактерій вважається вертикальне перенесення від батьків до потомства. Дані види ендосимбіотичних бактерій є цікавим об'єктом для вивчення, оскільки відомо, що створюючи репродуктивну ізоляцію між популяціями певних видів та будучи здатними вбудовувати частини свого геному в геном хазяїна, вони мають усі засоби до прямого впливу на еволюцію своїх хазяїв [4, 5]. Існують деякі свідчення горизонтального перенесення цих бактерій між хазяїном та паразитом через прямий контакт між їх тканинами [6]. Проте нічого не відомо про можливість такого перенесення без наявності паразитичних контактів між видами. Таким чином, вважається, що ендосимбіотичні бактерії переважно передаються трансваріальним шляхом, що утруднює розуміння такого широкого поширення цих видів у природних популяціях конкретних видів зокрема та комах загалом. Метою нашого дослідження було перевірити можливість горизонтального перенесення бактерій роду *Wolbachia* від коменсальних кліщів *Tyrophagus putrescentiae*, які мешкають на одному субстраті з плодовими мушками роду *Drosophila*, а саме до особин *Drosophila melanogaster*.

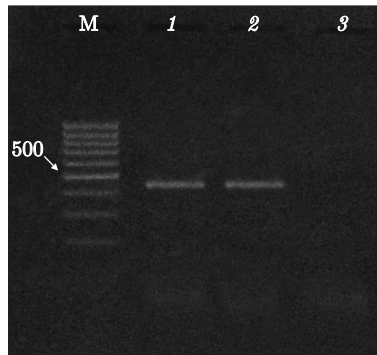


Рис. 1. Визначення наявності *Wolbachia* sp. у *Tyrophagus noxius*. М — маркер молекулярної маси (100 bp); 1 — фрагмент 16S рДНК *Wolbachia* sp.; 2 — позитивний контроль ПЦР для *Wolbachia* sp. (лінія дикого типу *D. melanogaster* “Умань”); 3 — негативний контроль ПЦР для *Wolbachia* sp. (лінія *D. melanogaster* після тетрацикліну)

Методи. Кліщів відбирали з пробірок, в яких культивувались плодові мушки виду *D. melanogaster* в умовах колекції дрозофілід кафедри загальної та молекулярної генетики Київського національного університету ім. Тараса Шевченка. Частину кліщів переносили в пробірки зі свіжим середовищем, а іншу частину — у пробірки з середовищем, яке містило антибіотик тетрациклін у концентрації 0,2 мкг/мл. З літератури відомо, що цей антибіотик ефективно вбиває бактерій роду *Wolbachia* [7].

Присутність ДНК ендосимбіотичних бактерій у зразках ДНК дрозофіл виявляли за допомогою ПЛР зі специфічними праймерами до 16S рДНК. У випадку *Wolbachia* sp. праймери були специфічні до фрагмента 438 по (WspecF, WspecR) [8]; для *Cardinium* sp. — до фрагмента в 393 по (Ch-F, Ch-R) [2]; для *Spiroplasma* sp. — до фрагмента в 421 по (SpoulF, SpoulR) [9]. Використовувалася така ПЛР програма для 16S рДНК: денатурація 93 °С/2 хв, 30 циклів денатурація 93 °С/30 с, відпал 56 °С/30 с для *Wolbachia* sp. та 48–52 °С/30 с для *Cardinium* sp. та *Spiroplasma* sp. відповідно, елонгація 72 °С/45 с для *Wolbachia* sp. та 72 °С/30 с для *Cardinium* sp. та *Spiroplasma* sp., фінальна елонгація 72 °С/8 хв.

Праймери для генів білків поверхневої мембрани (*wsp*) бактерій *wsp81f* та *wsp691r*, які широко застосовуються для ампліфікації фрагментів цього гена *Wolbachia* завдовжки 590–636 по, використовували у відповідності до [10]. ПЛР програма для ампліфікації фрагментів гена *wsp* була такою: денатурація 94 °С/2 хв 50 с, далі 35 циклів денатурації 94 °С/30 с, відпалу 55 °С/40 с, елонгації 72 °С/50 с; фінальна елонгація 72 °С/7 хв.

Сиквенс ДНК застосовували для встановлення рівня гомології між напрацьованими фрагментами *Wolbachia* 16S рДНК та гена *wsp*, які виділяли з кліщів та мух. Аналіз сиквенсів проводили із застосуванням програм Vector NTI та BLAST.

Результати та їх обговорення. На початку експерименту 16S рДНК бактерій роду *Wolbachia* була виявлена в зразках ДНК піддослідних кліщів (рис. 1). Наявність *Cardinium* sp. та *Spiroplasma* sp. встановлено не було.

Ефективність тетрацикліну визначали за допомогою вирощування кліщів та мушок на середовищі з антибіотиком, після чого перевіряли наявність ДНК бактерій в них. ДНК 16S рДНК *Wolbachia* як у кліщів, так і у дрозофіл після обробки тетрацикліном виявлена не була (рис. 2).

Незаражених мушок (після обробки тетрацикліном) вирощували протягом 12 поколінь разом із зараженими кліщами. Зразки ДНК мушок перевіряли на наявність ДНК бакте-

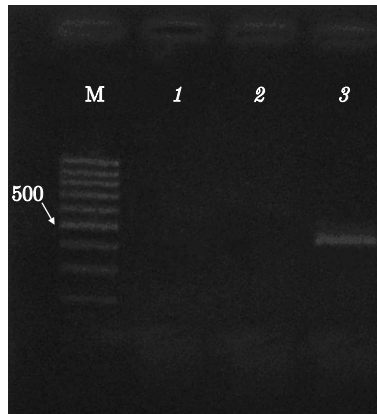


Рис. 2. Визначення наявності *Wolbachia* sp. у *Drosophila melanogaster* (Canton-S) після обробки тетрацикліном перед постановкою експерименту.

М — маркер молекулярної маси (100 bp); 1 — відсутність фрагмента 16S рДНК *Wolbachia* sp.; 2 — негативний контроль ПЦР; 3 — позитивний контроль ПЦР для *Wolbachia* sp. (лінія дикого типу *D. melanogaster* “Умань”)

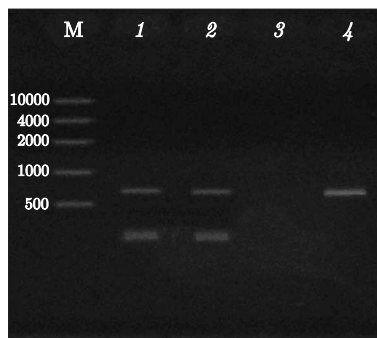


Рис. 3. Визначення наявності *Wolbachia* sp. у *Drosophila melanogaster* (Canton-S) та *Tyrophagus noxius* після 9 поколінь співіснування.

М — маркер молекулярної маси FastRuler High Range (“Fermentas”); 1 — фрагмент гена *wsp* *Wolbachia* sp. у зразках ДНК *T. noxius*; 2 — фрагмент гена *wsp* *Wolbachia* sp. у зразках ДНК *D. melanogaster* (Canton-S); 3 — негативний контроль ПЦР для *Wolbachia* sp. (лінія *D. melanogaster* після обробки тетрацикліном); 4 — позитивний контроль ПЦР (фрагмент 18S рДНК лабораторної лінії Canton-S *D. melanogaster*)

рій тричі — після 2, 9 та 12-го покоління. Після 2-го покоління ДНК бактерій у зразках не виявлено. Її наявність встановлено після 9-го покоління (рис. 3). Дрозофіли залишались інфікованими і в перевірці після 12-го покоління, що свідчить про стійке спадкування переданої інфекції в поколінні мух. Аналіз послідовності генів *wsp* показав, що штам бактерій (*wMel*) був специфічним для виду *D. melanogaster*. Цей штам виявлено в усіх тестах протягом експерименту як у кліщів, так і у плодових мушок. Таким чином, отримано експериментальне підтвердження горизонтального перенесення ендосимбіотичних бактерій роду *Wolbachia* між коменсальними видами *T. noxius* та *D. melanogaster*.

На даному етапі механізм такого перенесення невідомий і потребує подальшого вивчення. Проте одержані нами результати вказують на те, що шляхи розповсюдження ендосимбіотичних бактерій комах можуть не обмежуватись лише вертикальним перенесенням від батьків до потомства, а можуть включати й інші вектори перенесення, які дають їм значно більше можливостей поширення серед комах. Оскільки різні штами деяких бактерій,

зокрема *Wolbachia*, здатні спричиняти репродуктивну ізоляцію всередині популяцій, наявність таких шляхів перенесення може мати серйозний вплив на еволюцію комах.

1. Werren J. H., Zhang W., Guo L. R. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods // Proc. Roy. Soc. London. B. Biol. Sci. – 1995. – **261**, No 1360. – P. 55–63.
2. Zchori-Fein E., Perlman S. J. Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods // Mol. Ecol. – 2004. – **13**, No 7. – P. 2009–2016.
3. Williamson D. L., Whitcomb R. F., Tully J. G. et al. Revised group classification of the genus *Spiroplasma* // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1998. – **48**. – P. 1–12.
4. Nikoh N., Tanaka K., Shibata F. et al. *Wolbachia* genome integrated in an insect chromosome: evolution and fate of laterally transferred endosymbiont genes // Genome Res. – 2008. – **18**, No 2. – P. 272–280.
5. Hotopp J. C. D., Clark M. E., Oliveira D. C. et al. Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes // Science. – 2007. – **317**, No 5845. – P. 1753–1756.
6. Rigaud T., Juchault P. Success and failure of horizontal transfer of feminizing *Wolbachia* endosymbionts in woodlice // J. Evol. Biol. – 1995. – **8**, No 2. – P. 249–255.
7. Fry A. J., Palmer M. R., Rand D. M. Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster* // Heredity. – 2004. – **93**, No 4. – P. 379–389.
8. Rasgon J. L., Gamston C. E., Ren X. Survival of *Wolbachia pipientis* in cell-free medium // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – **72**, No 11. – P. 6934–6937.
9. Kageyama D., Anbutsu H., Watada M. et al. Prevalence of a non-male-killing *Spiroplasma* in natural populations of *Drosophila hydei* // Ibid. – 2006. – **72**, No 10. – P. 6667–6673.
10. Zhou W., Rousset F., O'Neill S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences // Proc. Roy. Soc. London. B. Biol. Sci. – 1998. – **265**, No 1395. – P. 509–515.

Київський національний університет

ім. Тараса Шевченка

Інститут зоології ім. І. І. Шмальгаузена

НАН України, Київ

Надійшло до редакції 09.06.2010

O. O. Bilousov, L. O. Kolodochka, S. O. Zabludovska, I. A. Kozeretka

Horizontal transmission of intracellular endosymbiotic bacteria of the genus *Wolbachia* from the commensal mites *Tyrophagus noxius* to *Drosophila melanogaster*

*Insect endosymbiotic bacteria, especially intracellular species of the genera *Wolbachia* and *Cardinium*, are known to play an important role in populations of their hosts by influencing the sex ratio of the latter. However, the reasons of their wide spread among insect taxa are still poorly understood, as their primary transmission way is the vertical transmission from parents to progeny. We show for the first time that a similar horizontal transmission is possible in commensal systems as well.*