

ГОРОДНЯНСКИЙ И.Д.[✉], ВОРОБЬЕВА Л.И.Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина,
Украина, 61022, г. Харьков, площадь Свободы, 4[✉] alatarron@gmail.com, (050) 872-94-87; (057) 707-52-71**ВЛИЯНИЕ ПОДАВЛЕНИЯ ВНУТРЕННЕЙ МИКРОФЛОРЫ ТЕТРАЦИКЛИНОМ
НА УРОВЕНЬ ПРОЯВЛЕНИЯ ГИБРИДНОГО ДИСГЕНЕЗА *DROSOPHILA MELANOGASTER***

Цель. Оценить изменения частоты проявления гибридного дисгенеза в линии Oregon-R, наблюдаемые под воздействием тетрациклина. **Методы.** Исследовали линию *Drosophila melanogaster Oregon R (Cambridge)*, в геноме которой присутствуют полноразмерные и функционально активные копии МГЭ *hobo*. Также данная линия инфицирована вольбахией штамма *wMel*. Удаление вольбахии из организма осуществляли с помощью антибиотика тетрациклина. Уровень гибридного дисгенеза исследовали методом извлечения гонад мух и оценки их состояния. **Результаты.** В статье представлены результаты изучения влияния подавления внутренней микрофлоры *Drosophila melanogaster* – в частности, паразитической бактерии *Wolbachia pipientis* – на уровень проявления гибридного дисгенеза. После воздействия тетрациклина наблюдали значительное повышение доли дисгенных особей внутри линии. **Выводы.** Полученные результаты могут быть связаны с нарушением системы специфических взаимодействий организма-хозяина и внутренней микрофлоры. **Ключевые слова:** мобильные генетические элементы, гибридный дисгенез, *Drosophila melanogaster*, *Wolbachia pipientis*.

Мобильные генетические элементы (МГЭ) являются важным компонентом генома эукариот. Для *Drosophila melanogaster* подтверждена роль МГЭ как компонентов различных систем внутригеномной регуляции и внутрипопуляционных источников генетической изменчивости [1, 2]. Однако все еще крайне мало изучена взаимосвязь транспозиций мобильных элементов генома с действием других внутриорганизменных факторов, также влияющих на жизнеспособность и приспособленность особей и популяций *Drosophila melanogaster*. Одним из наиболее значимых среди подобных факторов может считаться действие паразитической бактерии *Wolbachia pipientis* [3, 4].

Wolbachia pipientis – граммотрицательная неподвижная бактерия. Геном вольбахии невелик (у штамма *wMel* – 1267782 пар оснований), что характерно для облигатных внутриклеточных паразитов [5]. Однако в нем обнаружено необычайно большое количество мобильных генетических элементов (МГЭ) [5]. Это представляет собой эволюционный парадокс, потому как в ходе упрощения генома мобильные генетические элементы, предположительно, должны элиминироваться в первую очередь.

У научной литературе встречаются упоминания о возможном обмене участками генома вольбахии с X-хромосомой хозяина в процессе образования половых клеток [6, 7]. Однако некоторые авторы утверждают, что не нашли практического подтверждения таким данным [8].

Кроме того, имеется информация о родстве некоторых МГЭ вольбахии с мобильными элементами генома различных видов артропод, являющихся ее хозяевами [5]. На основании этого можно сделать предположение о возможности периодического инфицирования вольбахии некоторыми мобильными элементами хозяев и, как следствие, совместного их распространения. Значительное количество повторяющихся последовательностей в геноме, в таком случае, может рассматриваться как защитное приспособление для компенсации действия таких занесенных извне МГЭ [4, 5, 7].

Схема проявления цитоплазматической несовместимости, вызываемой вольбахией у некоторых артропод, кажется весьма похожей на схему проявления возникающего в результате транспозиций мобильных генетических элементов гибридного дисгенеза (P-M и I-R системы гибридного дисгенеза), хотя механизмы их воздействия различны. Впрочем, механизмы возникновения цитоплазматической несовместимости на данный момент все еще не определены. Предлагается несколько теорий воздейст-

вия вольбахии на геном клетки-хозяина, однако ни одна из них не дает полного их объяснения [9]. Сегодня наиболее приближенной к истине считается теория «ключа и замка» («lock and key»), объясняющая механизм возникновения цитоплазматической несовместимости действием неких «чужеродных элементов», синтезируемых вольбахией и присоединяющихся к хромосомам хозяина в процессе мейоза. Данная теория также может служить косвенным подтверждением возможного взаимодействия вольбахии с геномом клетки-хозяина.

На основании вышеизложенного мы можем сделать предположение об одном из возможных путей взаимодействия вольбахии с мобильными генетическими элементами *D. melanogaster*. Другой возможный путь – опосредованное их взаимодействие через реакцию на общую приспособленность особи. Полный набор функций, выполняемых мобильными элементами как инструментом внутригеномной регуляции, на данный момент остается неизвестным [2]. *W. pipientis* для многих артропод, в том числе и дрозофилы, может считаться скорее мутуалистом, нежели паразитом [4, 7, 10, 11], играя значительную роль, например, в приспособлении к неблагоприятным условиям окружающей среды и регуляции соотношения полов в популяции. Можно утверждать, что и мобильные элементы генома, и вольбахия являются для *D. melanogaster* важными компонентами различных регуляторных систем, и, как следствие, их действия в рамках ответа на воздействие различных неблагоприятных факторов должны быть каким-либо образом скоординированы. В некоторых работах выдвигались предположения о возможном взаимодействии вольбахии с мобильными элементами генома, однако авторы ограничились общими предположениями. Конкретной информации о типе подобных взаимодействий нами в литературных источниках найдено не было.

Целью данной работы являлась оценка изменений частоты проявления гибридного дисгенеза в линии Oregon-R, инфицированной вольбахией (согласно литературным данным, штамма wMel), наблюдаемых при воздействии антибиотика тетрациклина. Результаты могут представлять интерес с точки зрения оценки возможности взаимосвязи проявления гибридного дисгенеза с влиянием вольбахии на организм *D. melanogaster*.

Материалы и методы

В исследовании использовали линию *Drosophila melanogaster* Oregon R (Cambridge). В геноме линии Oregon-R мы предполагаем наличие полноразмерных и функционально активных копий МГЭ *hobo*. Также линия считается инфицированной *Wolbachia pipientis*, что подтверждено при помощи окрашивания клеток гонад мух по Грамму.

Содержали линию на стандартной дрожжевой среде при температуре 23°C. Для наркотизации применялся диэтиловый эфир.

Удаление вольбахии из организма проводили методом содержания мух на среде с добавлением антибиотика тетрациклина в концентрации 0,25 мг на 1 мл среды [3, 8]. Согласно литературным данным, исчезновение вольбахии происходит в пятом из поколений, подвергавшихся воздействию тетрациклина. В нашем исследовании использовали мухи первого, пятого и седьмого поколений, полученные на содержащей тетрациклин среде. Далее седьмое поколение было пересажено на нормальную среду для восстановления внутренней микрофлоры организма. В исследовании использовали пятое из поколений, полученных после пересадки на нормальную среду. Всего произвели оценку состояния гонад в пяти выборках: контрольной линии, первом, пятом и седьмом поколениях, полученных на тетрациклиновой среде, и пятом из поколений, полученных после пересадки линии на нормальную среду. Всего было исследовано гонады 4267 особей *D. melanogaster*.

Потомство от скрещиваний разделяли по полу в течение суток после выхода из пупариев на протяжении всего периода вылета имаго. Суточные выборки самцов и самок содержали отдельно на свежей среде до полного развития гонад (трехдневный период), чтобы минимизировать возможную погрешность эксперимента. По истечении трех дней с момента отсадки производили извлечение гонад и оценку их состояния. Состояние гонад оценивали по четырехбалльной шкале: 1 – обе гонады нормально развиты; 2 – одна или обе гонады немного меньше нормального размера (в процессе исследования решили считать это состояние близким к норме); 3 – недоразвита или полностью редуцирована одна из гонад; 4 – редукция обеих гонад.

Достоверность различий выборок в эксперименте оценивали с помощью критерия Краскела — Уоллиса. Для обработки данных исполь-

зовали компьютерные программы Microsoft Office Excel 2010 и STATISTICA 8.0.

Результаты и обсуждение

После перемещения исследуемой линии на содержащую тетрациклин среду было замечено значительное увеличение доли особей, у которых наблюдали признаки гибридного дисгенеза как среди самок, так и среди самцов.

Подобный результат, по нашему мнению, является скорее ответом на общий стресс организма, вызванный подавлением его нормальной внутренней микрофлоры, чем признаком нарушения каких-то специфических взаимодействий вольбахии и организма-хозяина.

В таком случае следовало бы ожидать постепенного снижения уровня гибридного дисгенеза либо в ряду поколений, содержащихся на

среде с тетрациклином, либо же – пересаженных на обычную среду и восстановивших (насколько это возможно) внутреннюю микрофлору. Однако нами не было выявлено ожидаемой разницы – доля дисгенных особей в исследуемых первом, пятом и седьмом поколениях содержащихся на тетрациклиновой среде мух были незначительны и незначимы.

Поскольку прекращение действия тетрациклина на организм само по себе также можно считать сильным стрессовым фактором, было решено исследовать пятое поколение линии Oregon R после пересадки ее на обычную среду. К пятому поколению, по нашим предположениям, должно было произойти частичное восстановление нормальной внутренней микрофлоры особей, насколько оно возможно в лабораторных условиях.

Таблица. Изучение состояния гонад особей *D. melanogaster*

Состояние гонад	контроль		Tetr 1		Tetr 5		Tetr 7		Norm 5	
	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m
1, 2 (%)	92,2	93,8	83,9	80,7	84,0	81,0	84,1	81,0	87,9	85,6
3 (%)	5,1	3,6	10,9	9,8	10,05	9,5	9,9	9,3	6,9	7,0
4 (%)	2,7	2,6	5,2	9,5	6,0	9,5	6,0	9,7	5,2	7,4
n (особей)	488	496	381	327	439	391	445	419	461	430

Примечания: f – самки; m – самцы; Tetr 1, 5, 7 – первое, пятое и седьмое поколения, выращенные на содержащей тетрациклин среде; Norm 5 – пятое поколение после пересадки поколения Tetr 7 на нормальную среду; 1, 2 – нормальное и близкое к норме состояние гонад; 3 – односторонняя редукция гонад; 4 – полная редукция гонад. Различия экспериментальных выборок с контрольной значимы на уровне $p < 0,05$.

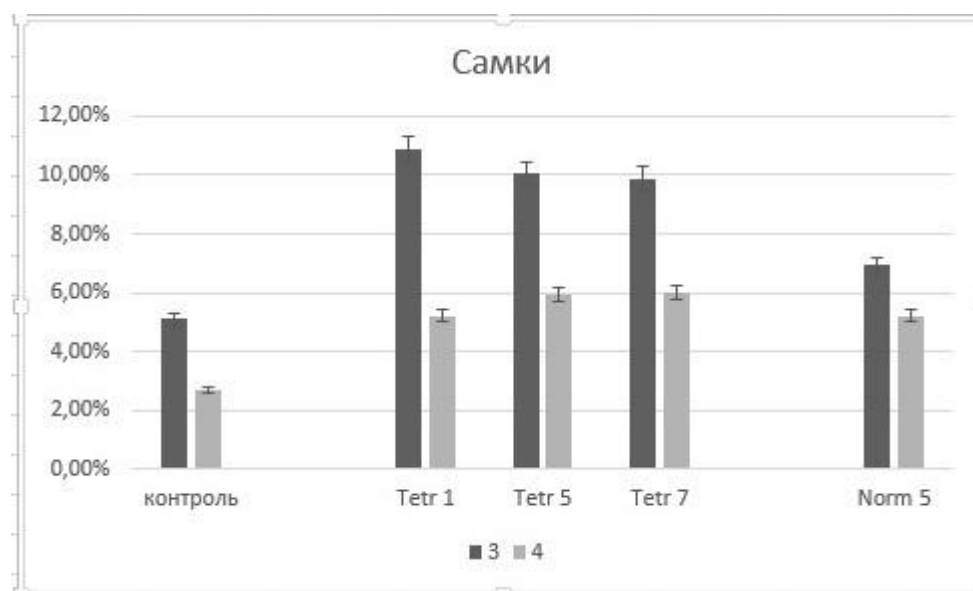


Рис. 1. Результаты исследования среди самок исследуемой линии. 3 и 4 – частичная и полная редукция гонад соответственно; Tetr 1, 5, 7 – первое, пятое и седьмое поколения на тетрациклиновой среде; Norm 5 – пятое поколение после пересадки на нормальную среду. Различия экспериментальных выборок с контрольной значимы на уровне $p < 0,05$.

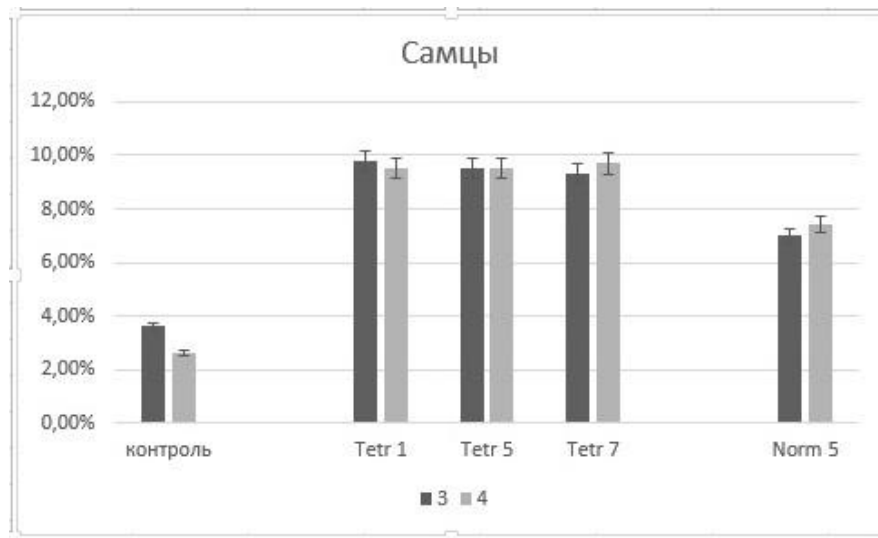


Рис. 2. Результаты исследования среди самцов исследуемой линии. 3 и 4 – частичная и полная редукция гонад (согласно разделу «материалы и методы»); Tetr 1, 5, 7 – первое, пятое и седьмое поколения на тетрациклиновой среде соответственно; Norm 5 – пятое поколение после пересадки на нормальную среду. Различия экспериментальных выборок с контрольной значимы на уровне $p < 0,05$.

В результате в пятом поколении особей *D. melanogaster* после пересадки на обычную среду наблюдалось значительное снижение уровня гибридного дисгенеза, однако он оставался значительно выше контрольного варианта. Наблюдаемый уровень гибридного дисгенеза сходен с наблюдаемым в данной линии при индукции транспозиций МГЭ повышенной температурой содержания.

Интересные результаты были получены при анализе соотношения количества случаев полной и неполной редукции гонад (рис. 1 и 2). В нормальных условиях как среди самок, так и среди самцов процент особей с частичной редукцией гонад был значительно выше, чем с полной. При посадке линии на содержащую тетрациклин среду данная тенденция сохраняется среди самок, среди самцов же (рис. 2) количество особей с односторонней и полной редукцией гонад отличается незначительно даже после пересадки на нормальную среду.

Нами было выдвинуто несколько предположений о том, что могло вызвать наблюдаемый эффект. Во-первых, активизация транспозиций МГЭ могла быть вызвана непосредственным влиянием на организм *D. melanogaster* тетрациклина. Однако в литературе нами не было обнаружено данных, способных подтвердить возможность возникновения такого эффекта. Во-вторых, причиной активизации транспозиций МГЭ послужил стресс, вызванный подавлением внутренней микрофлоры *D. melanogaster*.

Это предположение полностью объясняет высокий уровень гибридного дисгенеза в ряду поколений, однако в таком случае стоило ожидать более значительного снижения уровня гибридного дисгенеза через несколько поколений после пересадки линии на нормальную среду. И, наконец, в-третьих, активизация транспозиций МГЭ может являться признаком нарушения системы специфических взаимодействий организма-хозяина с внутренней микрофлорой. На основании литературных данных мы предполагаем, что такой эффект может быть связан с взаимодействием *Wolbachia pipientis* и МГЭ дрозофилы, однако данное предположение нуждается в дальнейшей проверке.

Выводы

1. Подавление внутренней микрофлоры организма мух тетрациклином оказалось сильным стрессовым фактором, влияющим на уровень проявления гибридного дисгенеза.

2. Через пять поколений содержания линии на нормальной среде без тетрациклина наблюдается небольшое снижение уровня проявления гибридного дисгенеза. Однако наблюдаемый уровень гибридного дисгенеза все еще значительно выше, чем в контрольном варианте.

3. Предполагается, что полученные результаты могут быть связаны с нарушением системы специфических взаимодействий организма-хозяина и внутренней микрофлоры. Полученные данные согласуются с нашим пред-

положением, что такой эффект может быть связан с взаимодействием *Wolbachia pipientis* и МГЭ дрозофилы, однако не могут служить явным его доказательством и поэтому нуждаются в дальнейшей проверке.

Авторы выражают благодарность Л.А. Атраментовой (Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, кафедра генетики и цитологии) за консультации и помощь в статистической обработке данных.

Литература

1. Васильева Л.А., Антоненко О.В., Захаров И.К. Роль мобильных генетических элементов в геноме *Drosophila melanogaster*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2011. Т. 15, № 2. С. 225–260.
2. Pimpinelli S., Berloco M., Fanti L., Dimitri P., Bonaccorsi S., Marchetti E., Caizzi R., Caggese C., Gatti M. Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1995. Vol. 92. P. 3804–3808.
3. Fry A.J., Palmer M.R., Rand D.M. Variable fitness effects of Wolbachia infection in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*. 2004. P. 1–11.
4. Weeks A.R., Turelli M., Harcombe W.R., Reynolds K.T., Hoffmann A.A. From parasite to mutualist: rapid evolution of Wolbachia in natural populations of *Drosophila*. *PLoS Biology*. 2007. Vol. 5, Iss. 7. P. 997–1005.
5. Wu M., Sun L.V., Vamathevan J. et al. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biology*. 2004. Vol. 2, Iss. 3. P. 0327–0341.
6. Kondo N., Nikoh N., Ijichi N., Shimada M., Fukatsu T. Genome fragment of Wolbachia endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002. Vol. 99, № 22. P. 14280–14285.
7. Borhershstein S.R., Marshall M.R., Fry A.J., Kim U., Wernegreen J.J. The tripartite association between bacteriophage, Wolbachia and Arthropods. *PLoS Pathogens*. 2006. Vol. 2, Iss. 5. P. 384–393
8. Серга С.В., Демидов С.В., Козерецкая И.А. Инфицирование *Wolbachia* не влияет на частоту кроссинговера у *Drosophila melanogaster*. *Цитология и генетика*. 2010. № 42. С. 55–60.
9. Poinot D., Charlat S., Mercot H. On the mechanism of of Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility: confronting the models with the facts. *BioEssays*. 2003. Vol. 25. P. 259–265.
10. Козерецкая И.А. Симбиотические бактерии, модифицирующие процессы репродукции у *Drosophila melanogaster*. *Мікробіологічний журнал*. 2011. Т. 73, № 2. С. 43–52.
11. Werren J.H., Baldo L., Clark M.E. Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. *Nature reviews Microbiology*. 2008. Vol. 6. P. 741–751.

References

1. Vasil'eva L.A., Antonenko O.V., Zakharov I.K. The role of mobile genetic elements in the genome of *Drosophila melanogaster*. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii*. 2011. Vol. 15, № 2. P. 225–260.
2. Pimpinelli S., Berloco M., Fanti L., Dimitri P., Bonaccorsi S., Marchetti E., Caizzi R., Caggese C., Gatti M. Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1995. Vol. 92. P. 3804–3808.
3. Fry A.J., Palmer M.R., Rand D.M. Variable fitness effects of Wolbachia infection in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*. 2004. P. 1–11.
4. Weeks A.R., Turelli M., Harcombe W.R., Reynolds K.T., Hoffmann A.A. From parasite to mutualist: rapid evolution of Wolbachia in natural populations of *Drosophila*. *PLoS Biology*. 2007. Vol. 5, Iss. 7. P. 997–1005.
5. Wu M., Sun L.V., Vamathevan J. et al. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements *PLoS Biology*. 2004. Vol. 2, Iss. 3. P. 0327–0341.
6. Kondo N., Nikoh N., Ijichi N., Shimada M., Fukatsu T. Genome fragment of Wolbachia endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002. Vol. 99, № 22. P. 14280–14285.
7. Borhershstein S.R., Marshall M.R., Fry A.J., Kim U., Wernegreen J.J. The tripartite association between bacteriophage, Wolbachia and Arthropods. *PLoS Pathogens*. 2006. Vol. 2, Iss. 5. P. 384–393
8. Serga S.V., Demidov S.V., Kozereckaya I.A. Infection with Wolbachia does not affect the frequency of crossing-over in *Drosophila melanogaster*. *Genetics and cytology*. 2010. № 42. P. 55–60.
9. Poinot D., Charlat S., Mercot H. On the mechanism of of Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility: confronting the models with the facts. *BioEssays*. 2003. Vol. 25. P. 259–265.
10. Belousov A.O., Kozereckaya I.A. Symbiotic bacteria modifying the reproductive processes in *Drosophila melanogaster*. *Microbiology journal*. 2011. Vol. 73, № 2. P. 43–52.
11. Werren J.H., Baldo L., Clark M.E. Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. *Nature reviews Microbiology*. 2008. Vol. 6. P. 741–751.

GORODNYANSKI I.D., VOROBYOVA L.I.

V.N. Karazin Kharkiv National University,
Ukraine, 61022, Svobody sq., Kharkiv, 4, e-mail: alatarron@gmail.com

EFFECT OF SUPPRESSION OF INTERNAL MICROFLORA BY TETRACYCLINE ON THE LEVEL OF MANIFESTATION OF THE HYBRID DYSGENESIS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Aim. The main goal of this article was to assess changes in the frequency of the development of hybrid dysgenesis in the *Oregon-R* line of *Drosophila melanogaster*, observed under the influence of tetracycline. **Methods.** The line of *Drosophila melanogaster Oregon R (Cambridge)*, in the genome of which there are full-sized and functionally active copies of the MGE *hobo*, was investigated. Also, this line is infected with wolbachia of the *wMel* strain. Removal of *Wolbachia* from the body was implemented using antibiotic tetracycline. The level of hybrid dysgenesis was studied by the method of extracting gonad flies and assessing their condition. **Results.** This article presents the results of studying the effect of suppression of the internal microflora of *Drosophila melanogaster* – in particular, the parasitic bacterium *Wolbachia pipientis* – on the level of manifestation of hybrid dysgenesis. After exposure to tetracycline, a significant increase in the proportion of dysgenic individuals within the line was observed. **Conclusions.** The results obtained may be associated with a violation of the system of specific interactions of the host organism and internal microflora.

Keywords: mobile genetic elements, hybrid dysgenesis, *Drosophila melanogaster*, *Wolbachia pipientis*.

ГОРОДНЯНСЬКИЙ І.Д., ВОРОБІЙОВА Л.І.

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна,
Україна, 61022, м Харків, майдан Свободи, 4, e-mail: alatarron@gmail.com

ВПЛИВ ПРИГНІЧЕННЯ ВНУТРІШНЬОЇ МІКРОФЛОРИ ТЕТРАЦИКЛІНОМ НА РІВЕНЬ ПРОЯВУ ГІБРИДНОГО ДИСГЕНЕЗА *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Мета. Оцінити зміни частоти прояви гібридного дисгенеза в лінії *Oregon-R Drosophila melanogaster*, що спостерігаються під впливом тетрацикліну. **Методи.** Досліджували лінію *Drosophila melanogaster Oregon R (Cambridge)*, в геномі якої присутні повнорозмірні і функціонально активні копії МГЕ *hobo*. Також надана лінія інфікована вольбахією штаму *wMel*. Видалення вольбахії з організму здійснювали за допомогою антибіотика тетрацикліну. Рівень гібридного дисгенеза досліджували методом вилучення гонад мух і оцінки їх стану. **Результати.** У статті представлено результати вивчення впливу пригнічення внутрішньої мікрофлори *Drosophila melanogaster* – зокрема, паразитичної бактерії *Wolbachia pipientis* – на рівень прояву гібридного дисгенеза. Після впливу тетрацикліну спостерігали значне підвищення частки дисгенних особин всередині лінії. **Висновки.** Отримані результати можуть бути пов'язані з порушенням системи специфічних взаємодій організму-господаря і внутрішньої мікрофлори.

Ключові слова: мобільні генетичні елементи, гібридний дисгенез, *Drosophila melanogaster*, *Wolbachia pipientis*.