

**ГОРОДНЯНСКИЙ И. Д.**

Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина,  
Украина, 61022, г. Харьков, площадь Свободы, 4, e-mail: [alataron@gmail.com](mailto:alataron@gmail.com), (050) 872-94-87,  
(057) 707-52-71

### ИЗМЕНЕНИЕ ВНУТРИЛИНЕЙНОГО УРОВНЯ ПРОЯВЛЕНИЯ ГИБРИДНОГО ДИСГЕНЕЗА *DROSOPHILA MELANOGASTER* В СКРЕЩИВАНИЯХ С ОСОБЯМИ С ПОДАВЛЕННОЙ ТЕТРАЦИКЛИНОМ ВНУТРЕННЕЙ МИКРОФЛОРОЙ

**Цель.** Оценить частоту проявления гибридного дисгенеза в потомстве реципрокных скрещиваний особей линии *Oregon-R* с особями этой же линии, из организма которых была элиминирована *Wolbachia pipientis*. **Методы.** Исследовали линию *Drosophila melanogaster Oregon R (Cambridge)*, в геноме которой присутствует МГЭ *hobo*. Данная линия инфицирована вольбахией штамма *wMel*. Удаление вольбахии из организма осуществляли с помощью антибиотика тетрациклина. В исследовании использовали пятое из поколений, полученных на нормальной среде после удаления вольбахии. Уровень гибридного дисгенеза исследовали методом извлечения гонад мух и оценки их состояния. **Результаты.** В потомстве от экспериментального скрещивания самок, из организма которых была элиминирована вольбахия, с самцами контрольной линии доля самок с полностью редуцированными гонадами значительно выше, чем в потомстве реципрокного ему скрещивания. **Выводы.** Полученные результаты могут являться признаком действия системы специфических взаимодействий *Wolbachia pipientis* и МГЭ дрозофилы.

**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]. Крайне мало изучена взаимосвязь транспозиций мобильных элементов генома с действием других внутриорганизменных факторов, одним из наиболее интересных для изучения среди подобных факторов может считаться действие паразитической бактерии *Wolbachia pipientis* [3, 4].

*Wolbachia pipientis* – граммотрицательная паразитическая бактерия с малоразмерным геномом, который, однако, включает в себя большое количество мобильных генетических элементов (МГЭ) [5]. Подобное явление необычно для паразитических организмов, при упрощении генома мобильные элементы чаще всего элиминируются в первую очередь [5].

Предполагается, что наличие большого числа мобильных генетических элементов служит для поддержания необходимого вольбахии уровня внутригеномной изменчивости. Существует предположение о возможном обмене участками генома вольбахии с X-хромосомой хозяина в процессе образования половых клеток [6], однако на данный момент этот вопрос остается спорным [6, 7].

Схема проявления цитоплазматической несовместимости, вызываемой вольбахией, сходна со схемой проявления возникающего в результате транспозиций мобильных генетических элементов гибридного дисгенеза. Механизмы возникновения цитоплазматической несовместимости на данный момент все еще не определены. Предлагается несколько теорий воздействия вольбахии на геном клетки-хозяина, 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 [8].

На основании вышеизложенного мы можем сделать предположение об одном из возможных путей взаимодействия вольбахии с мобильными генетическими элементами *D. melanogaster*. Можно утверждать, что и мобильные элементы генома, и вольбахия являются для

*D. melanogaster* важными компонентами различных регуляторных систем, и, как следствие, их действие в рамках ответа на воздействие различных неблагоприятных факторов должно быть каким-либо образом скоординировано. 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 научных литературных источниках найдено не было [9, 10].

Целью данной работы являлась оценка частоты проявления гибридного дисгенеза в потомстве рецiproкных скрещиваний особей линии Oregon-R, инфицированной вольбахией (согласно литературным данным, штамма wMel), с особями этой же линии, из организма которых была элиминирована *Wolbachia pipientis* с помощью воздействия 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, 9]. Согласно литературным данным, исчезновение вольбахии происходит в пятом из поколений, подвергавшихся воздействию тетрациклина. Для полной уверенности в гибели вольбахии не пятое, а 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 четырех выборках: контрольной линии; пятом из поколений, полученных после пересадки линии на

нормальную среду; потомства от скрещиваний самок пятого из поколений, полученных после пересадки линии на нормальную среду; с самцами контрольной линии и от скрещиваний самок контрольной линии с самцами пятого из поколений, полученных после пересадки линии на нормальную среду. Всего были исследованы гонады 3474 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 раздельно 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.

Статистический анализ выполнен с использованием непараметрического дисперсионного анализа с критерием *H* Краскела – Уоллиса. Расчёты произведены с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel 2010 и STATISTICA 8.0.

### Результаты и обсуждение

В обоих экспериментальных скрещиваниях было замечено значительное увеличение доли особей, у которых наблюдали признаки гибридного дисгенеза (табл.) как среди самок, так и среди самцов, по сравнению с контрольной линией ( $p < 0,05$ ). Наблюдаемый уровень гибридного дисгенеза сходен с наблюдаемым в данной линии при индукции транспозиций МГЭ повышенной температурой содержания. Этот эффект подавления внутренней микрофлоры тетрациклином был описан в статье 2018 года «Влияние подавления внутренней микрофлоры тетрациклином на уровень проявления гибридного дисгенеза *Drosophila melanogaster*» [11].

Интерес представляют различия доли особей с частично и полностью редуцированными гонадами среди самцов и самок экспериментальных скрещиваний с таковой внутри линии N5. Среди самок (рис. 1) наблюдается значительное повышение доли особей как с частично, так и с полностью редуцированными го-

надами в обоих экспериментальных скрещиваниях ( $p < 0,05$ ). Кроме того, в потомстве от скрещивания N5 × контроль доля самок с полностью редуцированными гонадами значительно выше, чем в потомстве реципрокного ему контроль × N5 ( $p < 0,05$ ).

Среди самцов (рис. 2) доля особей как с полностью, так и с частично редуцированными гонадами в потомстве обоих экспериментальных скрещиваний крайне незначительно отличается от показателей внутри линии N5.

У вида *D. melanogaster*, в отличие от других видов дрозофилы, цитоплазматическая совместимость, по литературным данным, проявляется крайне незначительно, и воздействие вольбахии нельзя достоверно определить по изменению плодовитости мух в системе реципрокных скрещиваний. Кроме того, сам механизм возникновения цитоплазматической несовместимости на данный момент остается неясным. Существует несколько теорий, но ни одна из них не подтверждена.

Таблица. Доля особей (%) с разной степенью редукции гонад в потомстве экспериментальных скрещиваний и контрольных линий

Скрещивания	Пол	Количество исследованных особей (n)	1, 2	3	4
Контроль	♀	488	92,2	5,1	2,7
	♂	496	93,8	3,6	2,6
N5	♀	461	87,9	6,9	5,2
	♂	430	85,6	7,0	7,4
N5 × контроль	♀	394	84,5	8,1	7,4
	♂	371	84,2	7,8	8,0
Контроль × N5	♀	422	86,4	7,6	6,0
	♂	412	85,2	7,5	7,3

Примечания: \* N5 – пятое поколение после пересадки седьмого из полученных на содержащей тетрациклин среде поколений на нормальную среду; N5 × контроль – потомство, полученное от скрещивания самок N5 с самцами контрольной линии; контроль × N5 – потомство, полученное от скрещивания самок контрольной линии с самцами N5; 1, 2 – нормальное и близкое к норме состояние гонад; 3 – односторонняя редукция гонад; 4 – полная редукция гонад.

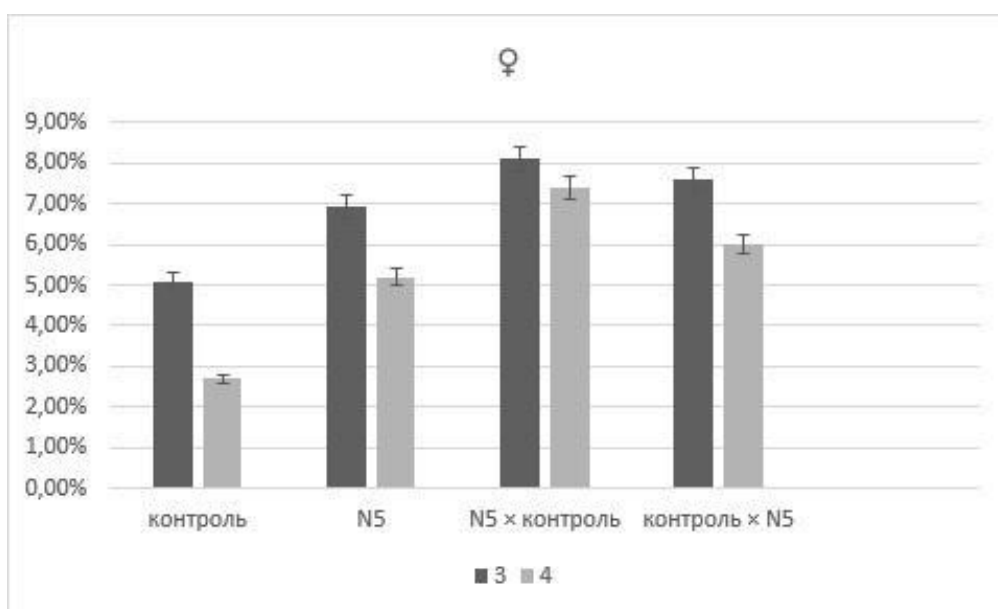


Рис. 1. Доля дисгенных особей (%) среди самок исследуемой выборки. 3 и 4 – частичная и полная редукция гонад соответственно.

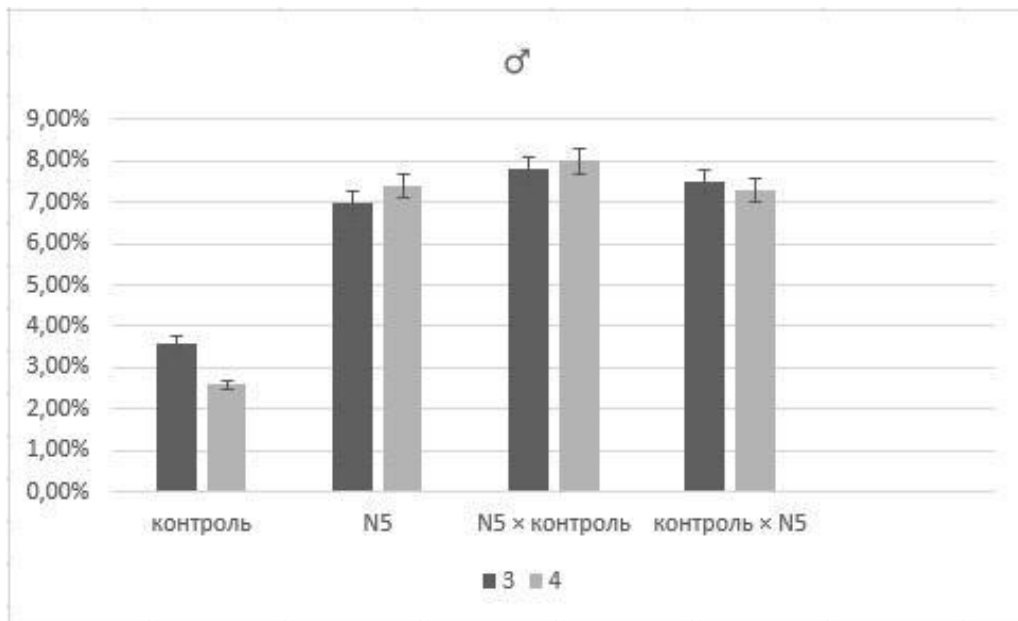


Рис. 2. Доля дисгенных особей (%) среди самцов исследуемой выборки. 3 и 4 – частичная и полная редукция гонад соответственно.

Штаммы вольбахии разделяются по способности модифицировать сперматозоиды хозяина, вызывая цитоплазматическую несовместимость (*mod* function) и способности противостоять подобным модификациям (*resc* function). Штаммы группы *wMel* считаются активными штаммами, способными как вызывать цитоплазматическую несовместимость, так и подавлять ее возникновение (*mod+*, *resc+*). Из-за неясности механизмов проявления этих функций нельзя предположить, с какой из них связана такая устойчивость *D. melanogaster* к проявлению цитоплазматической несовместимости. К тому же иногда при элиминации вольбахии из организма хозяин может сохранять способности противостоять возникновению цитоплазматической несовместимости (сохранять свойство *resc+*) [7, 8, 10].

В научной литературе [7] встречается предположение, что одной из функций вызываемой вольбахией цитоплазматической несовместимости может служить распространение в популяции организма-хозяина определённого специфического паттерна мобильных генетических элементов, связанного с данным штаммом вольбахии. Существует предположение о возможном обмене участками генома вольбахии с X-хромосомой хозяина в процессе образования половых клеток [6]. Тогда можно сделать предположение, что механизм сохранения свойства *resc+* может быть связан с действием МГЭ или, по крайней мере, ситуации, при которых может

возникнуть цитоплазматическая несовместимость, приведут к активации транспозиций МГЭ хозяина и понижению стабильности его генопа. В потомстве от скрещивания N5 × контроль, которое для других видов дрозофилы, возможно, могло бы привести к возникновению цитоплазматической несовместимости (самка из линии, выведенной от вольбахии, и самец из исходной линии, если у самки не сохранится свойство *resc+*), заметно значительное повышение доли самок как с частично, так и с полностью редуцированными гонадами (по сравнению как с реципрокным ему скрещиванием, так и с показателями внутри линий N5 и контрольной). Кроме того, значительно повышается доля самок с полностью редуцированными гонадами.

На основании этого можно выдвинуть предположение, что в данном случае активизация транспозиций МГЭ может являться признаком действия системы каких-либо специфических взаимодействий *Wolbachia pipientis* и МГЭ дрозофилы, однако данное предположение нуждается в дальнейшей проверке.

### Выводы

Различия уровней проявления гибридного дисгенеза в потомстве экспериментальных скрещиваний показывают наличие специфических взаимодействий *D. melanogaster* с ее внутренней микрофлорой, предположительно – *W. pipientis*.

Автор выражает благодарность Л. И Воробьевой за научное руководство, помощь и под-

держку и Л. А. Атраментовой за советы по статистическому анализу.

## 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 selektsii*. 2011. Vol. 15, № 2. P. 225–260. [in Russian] / 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., Riegler M., Deboy R., Brownlie J.C., McGraw E.A., Martin W., Esser Ch., Ahmadinejad N., Wiegand Ch., Madupu R., Beanan M.J., Eisen J.A. 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. Poinot D., Charlat S., Mercot H. On the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility: confronting the models with the facts. *BioEssays*. 2003. Vol. 25. P. 259–265.
9. Belousov A.O., Kozeret'skaya I.A. Symbiotic bacteria modifying the reproductive processes in *Drosophila melanogaster*. *Microbiology journal*. 2011. Vol. 73, № 2. P. 43–52. [in Russian] / Козерецкая И.А. Симбиотические бактерии, модифицирующие процессы репродукции у *Drosophila melanogaster*. *Мікробіологічний журнал*. 2011. Т. 73, № 2. С. 43–52.
10. Werren J.H., Baldo L., Clark M.E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature reviews Microbiology*. 2008. Vol. 6. P. 741–751.
11. Gorodnyanski I.D., Vorobyova L.I. Effect of suppression of internal microflora by tetracycline on the level of manifestation of the hybrid dysgenesis of *Drosophila melanogaster*. *Factors in elemental evolution of organisms*. 2018. Vol. 22. P. 34–39. [in Russian] / Городнянский И.Д., Воробьева Л.И. Влияние подавления внутренней микрофлоры тетрациклином на уровень проявления гибридного дисгенеза *Drosophila melanogaster*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2018. Т. 22. С. 34–39.

## GORODNYANSKI I. D.

V.N. Karazin Kharkiv National University,

Ukraine, 61022, Kharkiv, Svobody sq., 4, e-mail: alatarron@gmail.com

## CHANGES IN THE INTRALINEAR LEVEL OF HYBRID DYSGENESIS MANIFESTATION IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* IN CROSSES WITH INDIVIDUALS WITH TETRACYCLINE SUPPRESSED INTERNAL MICROFLORA

**Aim.** To assess the frequency of hybrid dysgenesis in the offspring of reciprocal crosses of individuals of the *Oregon-R* line, with individuals of the same line, from the organism of which *Wolbachia pipientis* was eliminated. **Methods.** The line of *Drosophila melanogaster Oregon R (Cambridge)*, in the genome of which there are MGE *hobo*, was investigated. This line is infected with *wolbachia* of the *wMel* strain. Removal of *Wolbachia* from the body was implemented using antibiotic tetracycline. The study used the fifth of the generations obtained on a normal handling medium after the removal of *Wolbachia*. The level of hybrid dysgenesis was studied by the method of extracting gonad flies and assessing their condition. **Results.** In the progeny from experimental crossing of females from which *Wolbachia* was eliminated, with males of the control line, the proportion of females with fully reduced gonads is significantly higher than in the offspring of reciprocal crossing. **Conclusions.** The results obtained may be a sign of the action of the system of specific interactions of *Wolbachia pipientis* and *Drosophila's* MGE.

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

**ГОРОДНЯНСЬКИЙ І. Д.**

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,

Україна, 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, e-mail: alataarron@gmail.com

**ЗМІНА ВНУТРІШНЬОЛІНІЙНОГО РІВНЯ ПРОЯВУ ГІБРИДНОГО ДИСГЕНЕЗУ *DROSOPHILA MELANOGASTER* У СХРЕЩУВАННЯХ З ОСОБИНАМИ З ПРИГНІЧЕНОЮ ТЕТРАЦИКЛІНОМ ВНУТРІШНЬОЮ МІКРОФЛОРОЮ**

**Мета.** Оцінити частоту прояву гібридного дисгенезу серед нащадків реципрокних схрещувань лінії *Oregon-R* з особинами цієї ж лінії, з організму яких було еліміновано *Wolbachia pipientis*. **Методи.** Досліджували лінію *Drosophila melanogaster Oregon R (Cambridge)*, у геномі якої присутні МГЕ *hobo*. Ця лінія інфікована вольбахією штаму *wMel*. Видалення вольбахії з організму здійснювали за допомогою антибіотика тетрацикліну. У дослідженні використовували п'яте з поколінь, що було отримано на нормальному середовищі після видалення вольбахії. Рівень гібридного дисгенезу досліджували методом вилучення гонад мух і оцінки їхнього стану. **Результати.** У потомстві від експериментального схрещування самок, з організму яких була елімінована вольбахія, з самцями контрольної лінії частка самок з повністю редукованими гонадами значно вища, ніж у потомстві реципрокного йому схрещування. **Висновки.** Отримані результати можуть бути ознакою дії системи специфічних взаємодій *Wolbachia pipientis* і МГЕ дрозофіли.

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