

## ИНФИЦИРОВАНИЕ *WOLBACHIA* НЕ ВЛИЯЕТ НА ЧАСТОТУ КРОССИНГОВЕРА У *DROSOPHILA* *MELANOGASTER*



*Исследовано влияние инфицирования эндосимбиотической бактерией Wolbachia на процессы рекомбинации в половой хромосоме Drosophila melanogaster на участке между генами white и cut. Проведен анализ частоты кроссинговера в различных вариантах скрещиваний линий, инфицированных и не инфицированных бактерией. Результаты показали отсутствие влияния инфицирования Wolbachia на частоту кроссинговера на исследованном участке X-хромосомы D. melanogaster.*

**Введение.** Еще в начале прошлого века школой Т. Моргана были начаты исследования процесса гомологической рекомбинации. Он впервые описал явление неполного сцепления у *Drosophila melanogaster* и, главное, дал удовлетворительное объяснение этого явления, назвав его кроссинговером [1]. С тех пор процесс рекомбинации вообще и кроссинговера в частности остается одним из важных предметов исследования генетиков, биохимиков и молекулярных биологов.

В настоящее время достаточно хорошо изучены механизмы и время прохождения кроссинговера, осознано его значение как фактора изменчивости организмов. В то же время показано, что частота кроссинговера достаточно переменный показатель и зависит от множества факторов [2, 3]. Известно, что формирование обменов хромосомом зависит от пола. Так, например, у самцов дрозофилы кроссинговер не происходит. На этот процесс значительно влияют возраст организма, воздействие температуры, особенно температурный стресс, плотность популяции, ионизирующее облучение. Кроме того, частота кроссинговера зависит от общей организации хромосомы: в окружении центромеры она значительно меньше, чем в средних частях плеч. Обнаружены и другие факторы, которые влияют на частоту процесса, такие как дополнительные хромосомы в геноме и хромосомные перестройки [2, 4].

При изучении частоты рекомбинации у потомков представителей природных популяций *D. melanogaster* Украины было зафиксировано статистически достоверное снижение частоты кроссинговера на участке X-хромосомы между генами *white* (*w:1–1.5*) и *cut* (*ct:1–20.0*). В этом эксперименте практически изучался кроссинговер у самок, гетерозиготных по двум X-хромосомам, одна из которых происходит из лабораторной линии *w ct*, другая – из различных природных популяций [5]. Полученный результат может быть связан как с некоторым нарушением гомологии на этом участке X-хромосомы, так и с влиянием внешних и внутренних факторов. Известно, что данный участок X-хромосомы является регионом с повышенной частотой встраивания мобильных генетических элементов (МГЭ) и, как следствие, уровнем рекомбинации, что противоречит полученному результату [6]. Другим из влияющих факторов могло быть инфицирование эн-

Таблица 1  
Родительские пары особей, участвовавших  
в постановке скрещиваний

№ скрещивания	Самка	Самец
	Прямые	
1	<i>C-S</i>	<i>w ct</i>
2	<i>C-S</i>	<i>w ct(t)</i>
3	<i>C-S(t)</i>	<i>w ct</i>
4	<i>C-S(t)</i>	<i>w ct(t)</i>
	Обратные	
5	<i>w ct</i>	<i>C-S</i>
6	<i>w ct(t)</i>	<i>C-S</i>
7	<i>w ct</i>	<i>C-S(t)</i>
8	<i>w ct(t)</i>	<i>C-S(t)</i>

досимбиотическими бактериями, эффекты которого на процессы гомологической рекомбинации ранее не изучались. Известно, что все вовлеченные в это исследование природные популяции были инфицированы бактерией *Wolbachia* [7]. Бактерия является эндосимбионтом беспозвоночных, вызывая модификации полового размножения, такие как цитоплазматическая несовместимость, андроцид, переход к партеногенезу и феминизация. *Wolbachia* широко распространена в природных популяциях насекомых не только Украины [8, 9]. Упомянутая бактерия является внутриклеточной и колонизирует в основном репродуктивные органы организмов-хозяев, передается вертикально через яйцеклетку от инфицированной самки к потомству [10], а это значит, что особенно высокие ее титры находятся непосредственно в клетках, в которых проходит кроссинговер.

Настоящая работа посвящена изучению возможного влияния инфицирования эндосимбиотической бактерией *Wolbachia* на процессы рекомбинации в половой хромосоме *D. melanogaster* на участке между генами *w* и *ct*.

**Материалы и методы.** В исследование были вовлечены четыре лабораторные линии *D. melanogaster*: *Canton-S*, инфицированная *Wolbachia* (*C-S*); *Canton-S* (*C-S(t)*), выведенная от бактерии; *w ct*, инфицированная *Wolbachia* (*w ct*); линия *w ct* без *Wolbachia* (*w ct(t)*). Линия *Canton-S* является лабораторной линией дикого типа, а *w ct* – лабораторная линия, которая несет мутации в генах: *white* – белые глаза и *cut* – обре-

занный край крыла. Перечисленные мутации являются рецессивными и локализованы в X-хромосоме *D. melanogaster* на расстоянии 18,5 сМ [11].

Линии *C-S* и *w ct* содержались на стандартной среде (на 1 л воды 6 г агара, 15 г дрожжей, 50 г сахара, 55 г манной крупы), тогда как линии *C-S(t)* и *w ct(t)* были выращены на среде с добавлением антибиотика тетрациклина в концентрации 0,25 мг/мл. Тетрациклин, являясь инактиватором малой субъединицы рибосом прокариотов, действует на ряд микроорганизмов, включая риккетсии, к которым относятся бактерии рода *Wolbachia* [12].

Все исследуемые линии были протестированы на наличие бактерии *Wolbachia* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для выделения ДНК из каждой линии было взято по 10 самок. ДНК выделяли с использованием QIAamp DNA Micro Kit («Qiagen», США). Наличие бактерии в препаратах ДНК насекомых определяли с использованием праймеров, которые специфичны к высококонсервативному фрагменту гена 16S рРНК *Wolbachia* длиной 438 п.о. (5'-CAT ACC TAT TCG AAG GGA TAG, 5'-AGC TTC GAG TGA AAC CAA TTC). ПЦР проводили по схеме: 3 мин при 94 °С, 30 циклов, состоящих из 30 с при 94 °С, 45 с при 55 °С, 60 с при 72 °С и 7 мин при 72 °С. Реакцию осуществляли в смеси 20 мкл (2 мкл ДНК, 4 мкл ПЦР буфера, 2 мкл MgCl<sub>2</sub>, 2 мкл 2,5 мМ dNTP, 2 мкл 20 мМ праймеров, 0,25 Taq, 8 мкл воды), которая была приготовлена для всех проб вместе, а уже потом добавляли ДНК. В качестве положительного контроля использовали ДНК из природной популяции *D. melanogaster* г. Киева, где диагностировано присутствие бактерии [7]. Для негативного контроля использовали ДНК лабораторной линии дикого типа *Drosophila virilis*, не содержащей представителей искомого эндосимбионта.

Далее были проведены следующие варианты скрещиваний линий, инфицированных *Wolbachia* и выведенных от бактерии (табл. 1).

Все скрещивания осуществляли в одинаковых условиях – на стандартной среде при температуре 25 °С. Потомство первого поколения из каждого скрещивания рассаживали в 20 пробирок по 4–5 самок и 2 самца в каждую. Подсчет кроссоверов проводили в каждой пробир-

ке второго поколения отдельно. Схема скрещиваний и ожидаемое потомство приведены на рис. 1.

Доля кроссоверных особей среди общего числа потомков второго поколения была подсчитана по формулам: число кроссоверов / общее количество самцов (в прямом скрещивании); число кроссоверов / общее число особей (в обратном скрещивании).

Процент кроссинговера вычислен по формуле: % кроссинговера = доля кроссоверов × 100 % [2].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Фишера [13].

**Результаты исследования.** Тестирование с помощью ПЦР всех исследуемых линий *D. melanogaster* показало наличие фрагмента гена 16S рРНК *Wolbachia* длиной 438 п.н. в лабораторных линиях *C-S* и *w ct*, а также отсутствие его в линиях *C-S(t)* и *w ct(t)*, содержащихся на среде с добавлением тетрациклина (рис. 2). Все скрещивания были проведены именно с потомками протестированных на наличие бактерии особей.

В результате скрещиваний во всех возможных вариантах линий *D. melanogaster*, инфицированных внутриклеточной бактерией *Wolbachia* и вылеченных от бактерии, было получено потомство первого поколения в каждом скрещивании в достаточном количестве, что может косвенно свидетельствовать об отсутствии несовместимости в скрещиваниях линий с *Wolbachia* и без нее. Известно, что бактерия способна вызывать цитоплазматическую несовместимость при скрещивании неинфицированных самок и инфицированных самцов, но у представителей вида *D. melanogaster* наблюдается незначительный процент несовместимости [12]. Поэтому получение нами достаточного количества особей во всех вариантах скрещиваний совпадает с литературными данными.

Потомство второго поколения в каждом скрещивании было проанализировано в каждой из 20 экспериментальных пробирок отдельно. Согласно схеме скрещиваний потомство F<sub>2</sub> разделилось на четыре фенотипических класса: особей дикого типа, особей с двумя мутациями *w ct* и особей только с одной мутацией или *w*, или *ct*. Особи, которые несут только одну мутацию, являются кроссоверными. Общее ко-

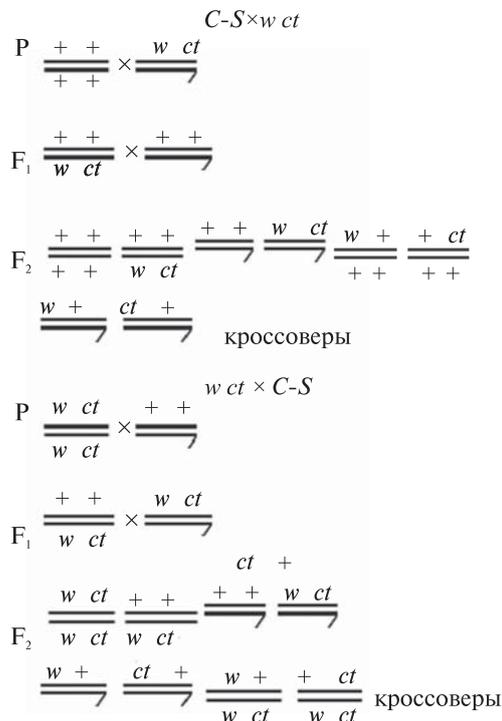


Рис. 1. Схема реципрокных скрещиваний линий *C-S* и *w ct* с указанием типа потомков в первом и втором поколениях

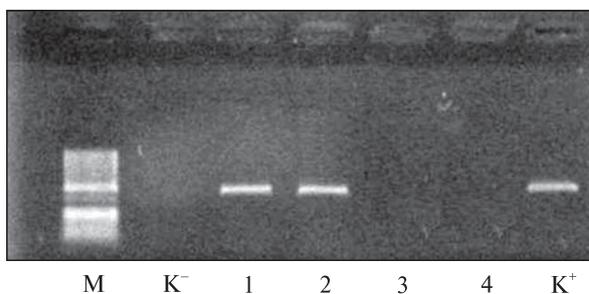


Рис. 2. Результаты тестирования линий *D. melanogaster* на наличие *Wolbachia* методом ПЦР; М – маркер молекулярной массы, К<sup>-</sup> – отрицательный контроль, 1 – *C-S*, 2 – *w ct*, 3 – *C-S(t)*, 4 – *w ct(t)*, К<sup>+</sup> – положительный контроль

личество проанализированных особей второго поколения в каждом скрещивании, а также количество кроссоверных особей приведены в табл. 2 и 3. В прямых скрещиваниях кроссоверными были только самцы, а в обратных – и самцы, и самки (рис. 1). Анализ прямых и обратных скрещиваний проводился отдельно. Для каждо-

Таблица 2  
**Частота рекомбинации в прямых скрещиваниях на участке между генами *w* и *ct* у потомков инфицированных и неинфицированных особей линий *C-S* и *w ct D. melanogaster***

Скрещивание	Количество особей		Количество самцов	Процент кроссинговера
	кроссо-верных	общее		
<i>C-S</i> × <i>w ct</i>	143	1397	700	20,4 ± 1,5
<i>C-S</i> × <i>w ct(t)</i>	161	1560	780	20,6 ± 1,5
<i>C-S(t)</i> × <i>w ct</i>	116	1365	683	17 ± 1,4
<i>C-S(t)</i> × <i>w ct(t)</i>	161	1708	854	18,9 ± 1,3

Таблица 3  
**Частота рекомбинации в обратных скрещиваниях на участке между генами *w* и *ct* у потомков инфицированных и неинфицированных особей линий *C-S* и *w ct D. melanogaster***

Скрещивание	Количество особей		Процент кроссинговера
	кроссо-верных	общее	
<i>w ct</i> × <i>C-S</i>	203	1425	14,3 ± 0,9
<i>w ct(t)</i> × <i>C-S</i>	217	1411	15,4 ± 1
<i>w ct</i> × <i>C-S(t)</i>	244	1428	17,1 ± 1
<i>w ct(t)</i> × <i>C-S(t)</i>	234	1503	15,6 ± 0,9

го скрещивания были подсчитаны доля кроссоверных особей в потомстве второго поколения и процент кроссинговера (табл. 2).

Сравнение при помощи критерия Фишера процента кроссинговера в прямом скрещивании линий, инфицированных *Wolbachia* (скрещивание 1), с процентом кроссинговера в остальных прямых скрещиваниях, где хотя бы одна линия была без бактерии (скрещивания 2–4), показало отсутствие статистически достоверных отличий между процентами кроссинговера в скрещиваниях линий с *Wolbachia* и линий без нее ( $F_{(1-2)} = 0,01$ ,  $F_{(1-3)} = 2,63$ ,  $F_{(1-4)} = 0,55$ , при  $F_{\text{табл.}} = 6,6$ ,  $p = 0,01$ ). Сравнение при помощи критерия Фишера процента кроссинговера в обратных скрещиваниях линии с *Wolbachia* (скрещивание 5) с процентом кроссинговера в остальных обратных скрещиваниях (скрещивания 6–8) показало также отсутствие достоверных отличий между процентами кроссинговера в скрещиваниях линий с

*Wolbachia* и линий без нее ( $F_{(5-6)} = 0,72$ ,  $F_{(5-7)} = 4,37$ ,  $F_{(5-8)} = 1,01$ , при  $F_{\text{табл.}} = 6,6$ ,  $p = 0,01$ ).

**Обсуждение полученных результатов.** Влияние *Wolbachia* на процессы рекомбинации организмов-хозяев ранее не изучалось, но возможно предположить механизмы воздействия инфицирования на данные процессы. Факторы, которые могут использоваться бактерией, должны иметь белковую и/или ДНКовую природу.

Что касается возможного влияния бактериальной ДНК, то, с одной стороны, в 2007 г. Хотопп и др. [14] доказали факт частичного и полного встраивания генома бактерии *Wolbachia* в геном организмов-хозяев, а с другой стороны, одними из факторов, которые влияют на прохождение кроссинговера, являются так называемые К-факторы, резко уменьшающие частоту кроссинговера в гетерозиготном состоянии и не влияющие на нее в гомозиготе [15]. К ним относят инсерции, транслокации и другие перестройки генетического материала. Перечисленные факторы затрудняют прохождение кроссинговера за счет влияния на процесс конъюгации, нарушая необходимую строгую гомологию, а также снижают выход кроссоверов за счет селективной элиминации нежизнеспособных кроссоверных продуктов [2], причем если у части организмов снижается частота кроссинговера только в пределах самой хромосомной перестройки, то у дрозофилы – и за ее пределами [16]. Показано, что *Wolbachia* может встраивать почти целый свой геном, который составляет около 1,3 млн п.о., в геном организма-хозяина [14], а значит, величина вставки сопоставима с расстояниями, которые значительно различаются при кроссинговере, ведь 1 % кроссинговера на рекомбинационной карте *D. melanogaster* соответствует приблизительно 500 000 п.о. на ее молекулярной карте [4]. Поэтому при встраивании полного генома бактерии процент кроссинговера должен был бы отличаться больше, чем на 2 % в скрещиваниях линий с *Wolbachia* в сравнении со скрещиванием линий без бактерии. Такое отклонение выходит за пределы статистической ошибки проводимого эксперимента, и должно было быть зафиксированным. Но подобных статистически достоверных отклонений на участке X-хромосомы *D. melanogaster* между генами *w*

и *ct* мы не наблюдали. В то же время пока ничего не известно о сайт-специфичности встраивания фрагментов или целого генома *Wolbachia* в геномы организмов-хозяев. Возможно, бактерия встраивает фрагменты своей ДНК не в любую точку генома хозяина, а такое событие происходит в одних местах чаще, чем в других.

На сегодняшний день исследований, посвященных упомянутой проблеме, опубликовано не было, и ничего не известно о наличии «горячих точек» встраивания на исследованном нами участке X-хромосомы *D. melanogaster*. Кроме того, во всех работах, посвященных встраиванию фрагментов генома бактерии в геном организма-хозяина, подчеркивается, что данное событие происходит чрезвычайно редко и его рассматривают как единичное событие в процессе сосуществования бактерии с организмом-хозяином [14, 17]. Демонстрировано, что встроенный бактериальный геном фланкирован МГЭ, содержащихся в нем аномально много [14, 18].

По разным оценкам МГЭ *D. melanogaster* занимают до 22 % всего генома [19]. Наличие МГЭ в геномах обоих организмов, а также сама возможность встраивания фрагментов ДНК бактерии в геном организма-хозяина позволяет предположить, что это может происходить путем сайт-специфической рекомбинации с использованием гомологии последовательностей МГЭ.

МГЭ *D. melanogaster* достигают довольно больших размеров (*roo* до 10 000 п.о.) и часто расположены не поодиночке, а группами, но в литературе существует мнение, что встраивание МГЭ либо никак не влияет на процесс кроссинговера у плодовой мушки [20], либо приводит к увеличению его частоты в определенных районах [21]. Можно предположить подобный сценарий событий и для *Wolbachia*, однако в нашем эксперименте мы наблюдаем отсутствие каких бы то ни было влияний на кроссинговер у *D. melanogaster*. Следовательно, на изученном нами участке если и предположить наличие встраивания, то воздействия на кроссинговер они не оказывали.

Второй возможный фактор влияния *Wolbachia* на рекомбинацию у *D. melanogaster* связан со специфическими белками бактерии. Одной

из уникальных особенностей *Wolbachia* является наличие белков с анкириновыми повторами, которые у прокариотов встречаются очень редко. Белки, имеющие анкириновые повторы, считаются типично эукариотическими регуляторными белками.

У бактерии штамма wMel таких белков насчитывается 23, что намного больше, чем у других бактерий. В основном они задействованы в регуляции клеточного цикла эукариотов, и белки бактерии проявляют заметное сходство с белками у организмов-хозяев.

Кроме того, в работе Wu et al. [18] было показано, что по крайней мере некоторые из них способны выводиться через секреторную систему типа IV бактерии в цитоплазму клетки-хозяина. Так как число бактерий в клетках хозяина достаточно велико, то и концентрация секретируемых ею белков должна достигать существенных значений. Возможно, один из таких белков способен влиять на процесс рекомбинации организма-хозяина.

Однако работ, посвященных данной проблеме, опубликовано не было, и функции секретируемых бактерией белков остаются неисследованными. Кроме того, известно, что встроенные в геном организма-хозяина гены бактерии транскрибируются [14, 17].

Таким образом остается также не выясненной возможность трансляции мРНК таких последовательностей и функции их продуктов, поскольку они находятся непосредственно в клетках организма-хозяина и могут тем или иным способом влиять на процессы рекомбинации в том числе.

Возможно, полученный нами результат касается только исследованного района X-хромосомы, а другие участки половой хромосомы и аутосом как на больших, так и на меньших расстояниях будут иметь иные характеристики процессов рекомбинации в присутствии эндосимбиотических бактерий. Более глубокое изучение закономерностей взаимоотношений насекомое—эндосимбионт, в том числе в области гомологической рекомбинации, требует дальнейших исследований.

*Авторы выражают благодарность А.В. Проценко за помощь в статистической обработке результатов и их интерпретации.*

S.V. Serga, S.V. Demidov, I.A. Kozeretka  
 INFECTION WITH *WOLBACHIA* DOES NOT  
 INFLUENCE CROSSING OVER  
 IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

The influence of infection with endosymbiotic bacteria *Wolbachia* on crossingover in *Drosophila melanogaster* between the *white* and *cut* genes in the X chromosome was studied. Reciprocal crosses have been conducted between infected and non-infected fruit fly strains. The results showed no significant effect of *Wolbachia* infection on the crossingover rates in *D. melanogaster* between the *white* and *cut* genes in X-chromosome.

С.В. Серга, С.В. Демидов, І.А. Козерецька

ІНФІКУВАННЯ *WOLBACHIA* НЕ ВПЛИВАЄ  
 НА ЧАСТОТУ КРОСИНГОВЕРА  
 У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Досліджено вплив інфікування ендосимбіотичною бактерією *Wolbachia* на процеси рекомбінації у статевій хромосомі *Drosophila melanogaster* на ділянці між генами *white* та *cut*. Було проведено аналіз частоти кросингвера у різних варіантах схрещувань інфікованих та не інфікованих бактерією ліній. Результати свідчать про відсутність впливу інфікування *Wolbachia* на частоту кросингвера на досліджуваній ділянці X-хромосоми *D. melanogaster*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Morgan T.H. Chromosomes and associative inheritance // Science. — 1911. — 34, № 880. — P. 636–638.
2. Жученко А.А., Король А.Б. Рекомбинация в эволюции и селекции. — М.: Наука, 1985. — 400 с.
3. Ashburner M. *Drosophila*. A laboratory handbook. — Cold Spring Harbor: Harbor Laboratory Press, 1989. — 1331 p.
4. Льюин Б. Гены. — М.: Мир, 1987. — 544 с.
5. Козерецька І.А., Проценко О.В., Демидов С.В. Рекомбінаційні події у нащадків представників природних популяцій *Drosophila melanogaster* України // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології: Зб. наук. пр. — Київ; Луганськ. — 2009. — Вип. 3, № 90. — С. 35–43.
6. González J., Lenkov K., Lipatov M., Macpherson J.M., Petrov D.A. High rate of recent transposable element-induced adaptation in *Drosophila melanogaster* // PLoS Biol., 2008. — 6(10): e251. doi: 10.1371/journal.pbio.0060251.
7. Серга С.В., Проценко А.В., Жук О.В., Козерецька І.А. *Wolbachia* sp. и соотношение полов в природных популяциях *Drosophila melanogaster* Украины // До-

сягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Зб. наук. пр. — К.: Логос, 2007. — Т. 1. — С. 304–308.

8. Werren J.H. Biology of *Wolbachia* // Annu. Rev. Entomol. — 1997. — 42. — P. 587–609.
9. Горячева И.И. Бактерии рода *Wolbachia* — репродуктивные паразиты членистоногих // Усп. соврем. биологии. — 2004. — 124, № 3. — С. 246–259.
10. Захаров И.А. Бактерии управляют половым размножением насекомых // Природа. — 1999. — № 5. — С. 48–57.
11. <http://flybase.org/>, 2009.
12. Fry A.J., Palmer M.R., Rand D.M. Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster* // Heredity. — 2004. — 93. — P. 379–389.
13. Атраментова Л.О., Утєвська О.М. Статистичні методи в біології: Підручник. — Харків, 2007. — 288 с.
14. Hotopp J., Clark M. E., Oliveira D.C.S.G., Foster J.M. et al. Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes // Science. — 2007. — 317. — P. 1753–1756.
15. Sturtevant A.H. A crossover reducer in *Drosophila melanogaster* due to an inversion of a section of a third chromosome // Biol. Zentr. Bl. — 1926. — 46. — P. 697–702.
16. Novitski E., Braver G. An analysis of crossing over with in a heterozygous inversion in *Drosophila melanogaster* // Genetics. — 1954. — 39, № 2 — P. 197–209.
17. 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. — P. 272–280.
18. Wu M., Sun L.V., Vamathevan J., Riegler M., Deboy R. et al. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: A streamlined genome overrun by mobile genetic elements // PLoS Biol., 2004. — 2(3): e69. doi:10.1371/journal.pbio.0020069.
19. Kapitonov V., Jurka J. Molecular paleontology of transposable elements in the *Drosophila melanogaster* genome // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2003. — 100. — P. 6569–6574.
20. Ананьев Е.В., Барский В.Е. Электронно-микроскопическая карта политенных хромосом слюнных желез дрозофилы. — М.: Наука, 1985. — 86 с.
21. Petrov D.A., Aminetzach Y.T., Davis J.C., Bensasson D., Hirsh A.E. Size Matters: Non-LTR Retrotransposable elements and ectopic recombination in *Drosophila* // Mol. Biol. Evol. — 2003. — 20, № 6. — P. 880–892.

Поступила 28.10.09