

УДК: 575.89

Відсутність кореляційного зв'язку між рівнем радіоактивного забруднення та інфікованістю *Wolbachia* в природних популяціях *Drosophila melanogaster* УкраїниН.В.Гора¹, Н.Д.Костенко¹, О.М.Майстренко², С.В.Серга¹, І.А.Козерецька¹¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка (Київ, Україна)²Університет Північної Дакоти (Фарго, США)
nazaragora@gmail.com

Визначено рівень інфікування ендосимбіотом *Wolbachia* природних популяцій *Drosophila melanogaster* з радіоактивно забруднених та умовно чистих локалітетів України. Даний показник виявився нижчим у популяції з найбільш радіоактивно забрудненого локалітету (Янів; 13,5 мкЗВ/год), у порівнянні з іншими 6 дослідженими природними популяціями України (з локалітетів Поліське, Водойма-охолоджувач ЧАЕС, Чорнобиль, Київ, Варва, Умань). Кореляційний аналіз не показав зв'язку між рівнем інфікування *Wolbachia* та радіаційним фоном локалітетів, у яких було зібрано живий матеріал у період серпень-вересень 2014 року.

Ключові слова: *Wolbachia*, *Drosophila melanogaster*, природні популяції, радіоактивне забруднення.

Отсутствие корреляционной связи между уровнем радиоактивного загрязнения и инфицированностью *Wolbachia* в природных популяциях *Drosophila melanogaster* Украины

Н.В.Гора, Н.Д.Костенко, О.М.Майстренко, С.В.Серга, И.А.Козерецкая

Определен уровень инфицирования *Wolbachia* природных популяций *Drosophila melanogaster* из радиоактивно загрязненных и условно чистых локалитетов Украины. Данный показатель оказался ниже в популяции из наиболее радиоактивно загрязнённого локалитета (Янов; 13,5 мкЗВ/год), по сравнению с другими 6 исследованными природными популяциями Украины (из локалитетов Полесское, Водоем-охладитель ЧАЭС, Чернобыль, Киев, Варва, Умань). Корреляционный анализ не показал связи между инфицированием *Wolbachia* и радиационным фоном локалитетов, в которых был собран живой материал в период август-сентябрь 2014 года.

Ключевые слова: *Wolbachia*, *Drosophila melanogaster*, природные популяции, радиоактивное загрязнение.

The lack of correlation between the level of radioactive contamination and infection with *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila melanogaster* from Ukraine

N.V.Gora, N.D.Kostenko, O.M.Maistrenko, S.V.Serga, I.A.Kozeretska

We analyzed *Wolbachia* infection rates in natural populations of *Drosophila melanogaster* from conditionally clean and contaminated localities in Ukraine. This parameter was lower in the most heavily contaminated locality (Janiv, 13.5 mSv/h) – 29.4% compared with the other 6 studied natural populations of Ukraine (from localities Poliske, Chernobyl NPP cooling pond, Chernobyl, Kyiv, Varva, Uman). We observed no correlation between *Wolbachia* infection rate and radiation background in the localities, where was collected samples in August-September 2014.

Key words: *Wolbachia*, *Drosophila melanogaster*, natural populations, radioactive contamination.

Вступ

Література містить низку даних щодо впливу радіаційного забруднення на живі організми та екосистему в цілому, отриманих після аварії на Чорнобильській атомній електростанції, яка відбулася у 1986 році (Möller, Mousseau, 2016). Багато досліджень були спрямовані на вивчення радіоактивного впливу на макроорганізми Чорнобильської зони відчуження (Mousseau, Möller, 2014). Але про ефект радіації в контексті симбіотичної асоціації організм-хазяїн та його мікробіота нічого не відомо. Такі взаємозв'язки можуть розглядатися в рамках хологеномної теорії еволюції, згідно з якою одиницею

природного добору є холобіонт (макроорганізм з усіма асоційованими з ним мікроорганізмами) та яка передбачає існування хологеному – сукупності генетичної інформації хазяїна та всіх його симбіонтів (Zilber-Rosenberg, Rosenberg, 2008). А отже, мікробіота може впливати на генетичні процеси в популяціях макроорганізмів. У цьому контексті особливий інтерес представляють так звані репродуктивні паразити, які успадковуються переважно трансваріально (по материнській лінії) і внаслідок різноманітних механізмів можуть забезпечувати своє розповсюдження в популяціях виду-хазяїна (Duron et al., 2008; O'Neil et al., 1997). Найбільш вивченою з таких бактерій є *Wolbachia*, яка інфікує більше 50% видів артропод (Weinert et al., 2015), включаючи *Drosophila melanogaster* (Серга, Козерецька, 2013). Таке поширення ендосимбіонта зумовлене мутуалістичними взаємостосунками з різними видами організмів-хазяїв або здатністю до репродуктивного паразитизму, під чим розуміють цитоплазматичну несумісність, перехід до партеногенезу, андроцид та фемінізацію (Stouthamer et al., 1999; Sun, Cline, 2009; Werren et al., 2008).

Як відомо, *D. melanogaster* є класичним модельним об'єктом, який протягом багатьох років досліджується і в контексті впливу радіаційного випромінювання на живі системи (Kohler, 1994). *Wolbachia* повсюдно інфікує природні популяції даного виду (Riegler et al., 2005), не викликаючи суттєвих модифікацій статевого розмноження, окрім низьких рівнів цитоплазматичної несумісності (Серга, Козерецька, 2013). Виявлена вона і в популяціях з високим рівнем радіаційного забруднення (Серга et al., 2014). Відомо, що *Wolbachia* інфікує клітини зародкового шляху, в яких безпосередньо відбуваються процеси, які призводять до спадкових змін. З одного боку, описані приклади підвищення життєздатності мутантних особин *D. melanogaster* за інфікування *Wolbachia*. Показано, що інфікування *Wolbachia* призводить до фенкопіювання норми за мутації у гені *Sxl* (відновлення фертильності у мутантних за цим геном особин) (Starr, Cline, 2002). З іншого боку, у деяких роботах продемонстровано, що інфікування штамом бактерії *wMel* пов'язано зі зниженням активності супероксиддисмутази (superoxide dismutase; SOD) (Wang et al., 2012), а присутність бактерії штаму *wRi* підвищує рівень пошкоджень ДНК у сперматоцитах іншого виду дрозофіли *Drosophila simulans* (Brennan et al., 2012). Такі результати можуть свідчити про посилення впливу мутагенів у присутності *Wolbachia*. Однак, вплив *Wolbachia* на організм-хазяїн за дії мутагенних чинників залишається далеким від розуміння, особливо за умов хронічного іонізуючого опромінення в природі.

Мета роботи полягала у з'ясуванні можливого зв'язку між частотою інфікування *Wolbachia* представників природних популяцій *D. melanogaster* України та рівнем радіоактивного забруднення територій, на яких мешкають останні, як можливого свідчення відповідних фенотипових ефектів бактерії.

Матеріали та методи

Збір живого матеріалу проводився польовою групою в період серпень-вересень 2014 року в 7 локалітетах України: Янів, Поліське, Водойма-охолоджувач ЧАЕС, Чорнобиль, Київ, Варва, Умань, перші чотири з яких знаходяться в Чорнобильській зоні відчуження (рис. 1). Фоновий рівень радіаційного забруднення визначався в місцях збору живого матеріалу за допомогою дозиметра Dosimeter-Radiometer MKS-05 «Terra-P» (табл.).

Представники природних популяцій *D. melanogaster* з відповідних локалітетів започаткували 203 ізосамкові лінії. З 10 особин-нащадків F1 кожної ізосамкової лінії за допомогою методу висолювання за стандартним протоколом здійснювалось виділення ДНК. Отримані зразки ДНК за допомогою ПЛР-аналізу перевірялися на наявність бактерії *Wolbachia*. Реакція проводилась з використанням специфічних праймерів (5'-САТАССТАТТСГААГГГАТАГ, 5'-АГСТТСГАТГААСССААТТС) до фрагмента гена 16S рРНК довжиною 438 п.о. (O'Neill et al., 1992) за наступних умов: денатурація 3 хв. при 94°C, 40 циклів (денатурація 30 с/94°C, відпал праймерів 40 с/53°C, синтез 40 с/72°C), заключний синтез 4 хв. при 72°C. Реакція проводилась в суміші об'ємом 20 мкл (3 мкл ДНК, 2 мкл 10x ПЛР буфера («Thermo Scientific», США, 100 mM Tris-HCl (pH 8.8 на 25°C), 500 mM KCl), 2 мкл 25 mM MgCl₂, 2 мкл 2 mM dNTP («Thermo Scientific», США), по 1 мкл 20 mM кожного праймера, 0,25 мкл Taq (5 од.акт/мкл, «Thermo Scientific», США), 9 мкл дистильованої води). Отримані продукти ПЛР візуалізували за допомогою горизонтального електрофорезу у 1%-му агарозному гелі в трис-боратній буферній системі.

Рівень інфікованості окремої природної популяції визначали відношенням інфікованих ліній до загальної кількості проаналізованих тієї ж популяції. Коефіцієнт кореляції рангів Спірмена (Spearman,

1904) застосували для пошуку кореляції між частотою інфікування та рівнем радіаційного забруднення. Розрахунки проводили в програмі R v.3.2.0 (R Core Team, 2015).

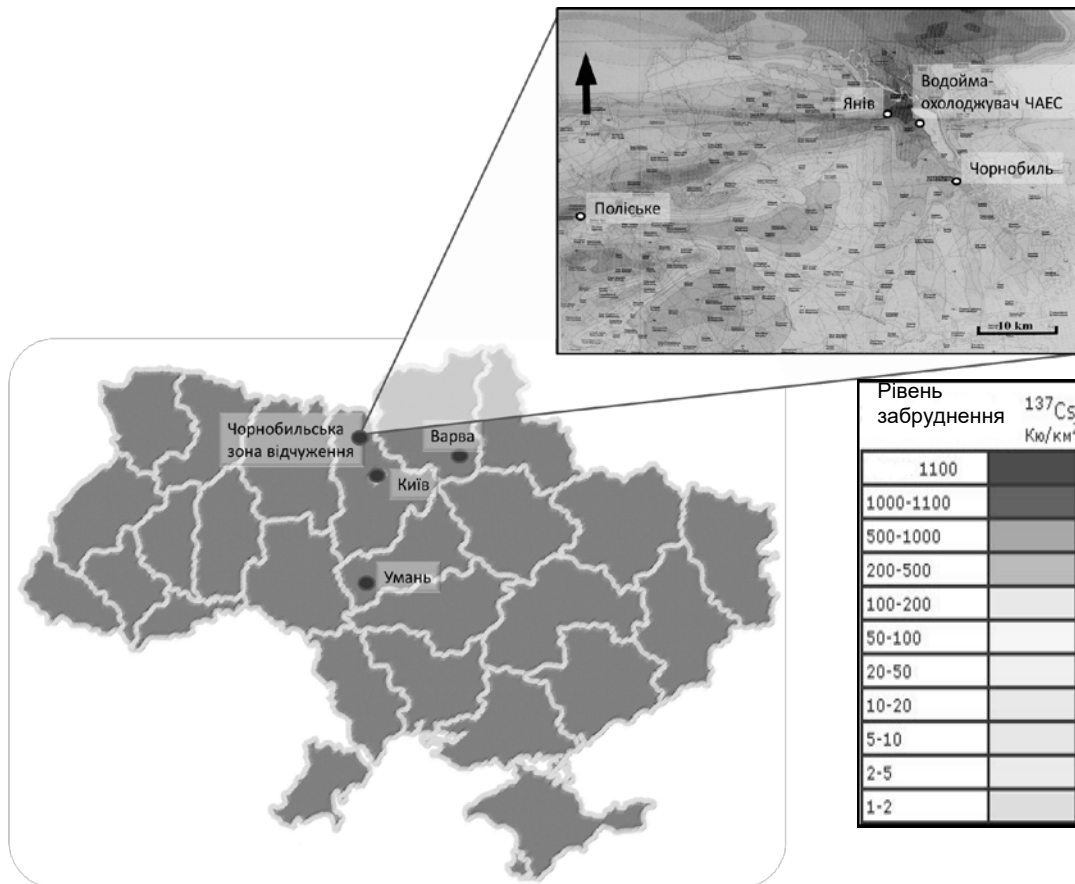


Рис. 1. Карта розташування локалітетів, в яких було зібрано природні популяції *D. melanogaster* в 2014 р. Вгорі представлена карта рівня радіаційного фону у Чорнобильській зоні відчуження (з <http://www.eurotrib.com>)

Результати та обговорення

Отримані рівні інфікованості ендосимбіонтом *Wolbachia* природних популяцій *D. melanogaster* України представлені в таблиці.

Рівень інфікованості в Янові, локалітеті з найвищим рівнем радіоактивного забруднення, достовірно нижчий, ніж в інших досліджених популяціях, включаючи умовно чисті (F, $p < 0,05$). Найвищий показник – в популяції з Києва, де фоновий рівень радіації в межах норми. Проте кореляційного зв'язку між рівнем радіаційного забруднення та інфікованістю ендосимбіонтом *Wolbachia* (коефіцієнт кореляції Спірмена $r_s = -0,5$, $n = 7$, $p = 0,2667$) (рис. 2) ідентифікувати не вдалося. Необхідно відзначити, що у зборах особин 2007 та 2008 років у зоні відчуження ЧАЕС у популяції з найвищим рівнем радіаційного фону (водойма-охолоджувач ЧАЕС – біля 20 мкЗв/год) у зразках ДНК, виділених з 25 особин з природної популяції, *Wolbachia* виявлена не була (Serga et al., 2014). Це може свідчити або про повну відсутність бактерії у популяції, або про дуже низький рівень інфікованості.

Згідно з отриманими результатами можна припустити, що інфікованість *Wolbachia* природних популяцій *D. melanogaster* при допороговому для нормальної життєдіяльності фоновому рівні радіації може обумовлюватися іншими механізмами, а при переході через порогове значення поширеність ендосимбіонта в природних популяціях плодової мухи знижується. На сьогоднішній день до кінця не зрозуміло, що саме визначає ту чи іншу частоту інфікованості бактерією природних популяцій *D. melanogaster*. Відома низка ефектів бактерії на пристосованість інфікованих особин, як наприклад, підвищення плодючості, резистентність до вірусних інфекцій, вплив на вибір партнера для

спаровування та інші (Серга, Козерецька, 2013). Проте жоден з вказаних ефектів не може до кінця пояснити широку поширеність бактерії та відмінність у рівнях інфікованості різних природних популяцій даного виду дрозофіли.

Таблиця.

Рівні інфікованості *Wolbachia* природних популяцій *D. melanogaster*

Популяція	Рівень радіаційного фону, мкЗв/год	Кількість проаналізованих ліній	Кількість інфікованих ліній	Рівень інфікованості, %
Варва	0,07	31	17	54,83 (36,03–72,68)*
Водойма-охолоджувач ЧАЕС	7	28	16	57,14 (37,18–75,54)*
Київ	0,13	36	23	63,89 (46,22–79,18)*
Умань	0,16	29	16	55,17 (35,69–73,55)*
Поліське	0,33	29	11	37,93 (20,69–57,74)*
Янів	13,5	34	10	29,41 (15,1–47,48)*
Чорнобиль	0,25	16	7	43,75 (19,75–70,12)*

Примітка: *в дужках вказано довірчий інтервал Клопера-Пірсона.

Отриманий результат є лише першим кроком у розумінні взаємовідносин симбіонтів та макроорганізмів у контексті впливу мутагенних факторів та адаптації до них. Потребуються подальші дослідження для виявлення механізмів таких ефектів та реальних наслідків інфікування бактеріями для організму-хазяїна та його природних популяцій за дії шкідливих факторів середовища. Крім того, залишається невирішеним питання про те, чи може інфікування певними бактеріями модифікувати частоти мутацій у виду-хазяїна або впливати на інші генетичні процеси.

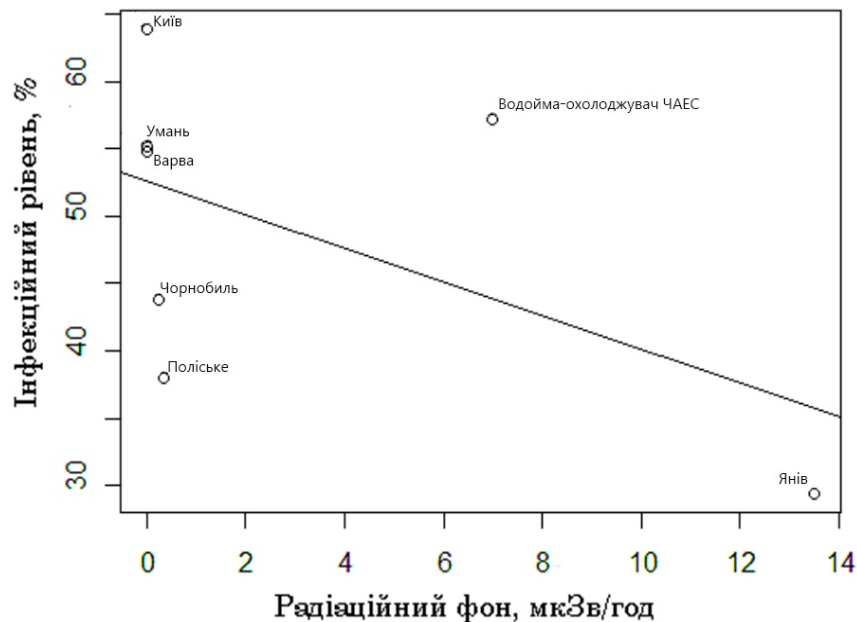


Рис. 2. Графік залежності рівня інфікованості від радіаційного фону місць збору особин

Отже, нами було визначено рівень інфікованості *Wolbachia* в природних популяціях *D. melanogaster* України з локалітетів з різним рівнем радіаційного забруднення. Виходячи з описаного вище, можна дійти висновку, що рівень інфікованості *Wolbachia* у досліджених популяціях *D. melanogaster* не залежить від рівня радіаційного забруднення, принаймні у зборах 2014 року. Однак

результат не заперечує існування особливих різноспрямованих взаємозв'язків між хазяїном та симбіонтом стосовно ефектів радіації.

Список літератури

- Serga S.V., Kozereckaya I.A. Загадка распространения *Wolbachia* в природных популяциях *Drosophila melanogaster* // Журнал общей биологии. – 2013. – Т.74, №2. – С. 99–111. /Serga S.V., Kozereckaya I.A. Zagadka rasprostraneniya *Wolbachia* v pryrodnykh populatsiyakh *Drosophila melanogaster* // Zhurnal obshchey biologii. – 2013. – Т.74, №2. – С. 99–111./
- Brennan L.J., Haukedal J.A., Earle J.C., Keddie B., Harris H.L. Disruption of redox homeostasis leads to oxidative DNA damage in spermatocytes of *Wolbachia*-infected *Drosophila simulans* // Insect Molecular Biology. – 2012. – Vol.21 (5). – P. 510–520. – doi: 10.1111/j.1365-2583.2012.01155.x.
- Duron O., Bouchon D., Boutin S. et al. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone // BMC Biology. – 2008. – Vol.27 (6). – P. 1–12. – doi: 10.1186/1741-7007-6-27.
- Kohler R.E. Lords of the fly: *Drosophila* genetics and the experimental life. – Chicago: University of Chicago Press, 1994. – 344p.
- Möller A.P., Mousseau T.A. Are organisms adapting to ionizing radiation at Chernobyl? // Trends Ecol. Evol. – 2016. – doi: 10.1016/j.tree.2016.01.005.
- Mousseau T.A., Möller A.P. Genetic and ecological studies of animals in Chernobyl and Fukushima // Journal of Heredity. – 2014. – Vol.105 (5). – P. 704–709. – doi: 10.1093/jhered/esu040.
- O'Neill S.L., Giordano R., Colbert A.M. et al. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol.89 (7). – P. 2699–2702.
- O'Neill S.L., Hoffmann A.A., Werren J.H. Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction. – Oxford University Press, Oxford – 1997. – 214p.
- Riegler M., Sidhu M., Miller W.J., O'Neill S.L. Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster* // Curr. Biol. – 2005. – Vol.15 (15). – P. 1428–1433. – doi: 10.1016/j.cub.2005.06.069.
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (<https://www.R-project.org/>)
- Serga S., Maistrenko O., Rozhok A. et al. Fecundity as one of possible factors contributing to the dominance of the wMel genotype of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila melanogaster* // Symbiosis. – 2014. – Vol.63 (1). – P. 11–17. – doi: 10.1007/s13199-014-0283-1.
- Spearman C. The proof and measurement of association between two things // Am. J. Psychol. – 1904. – Vol.15 (1). – P.72–101.
- Starr D.J., Cline T.W. A host parasite interaction rescues *Drosophila* oogenesis defects // Nature. – 2002. – Vol.418 (6893). – P. 76–79. – doi: 10.1038/nature00843.
- Stouthamer R., Breeuwer J.A.J., Hurst G.D.D. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction // Ann. Rev. Microb. – 1999. – Vol.53. – P. 71–102. – doi: 10.1146/annurev.micro.53.1.7.
- Sun S., Cline T.W. Effects of *Wolbachia* infection and ovarian tumor mutations on Sex-lethal germline functioning in *Drosophila* // Genetics. – 2009. – Vol.181 (4). – P. 1291–1301. – doi: 10.1534/genetics.108.099374.
- Wang L., Zhou C., He Z. et al. *Wolbachia* infection decreased the resistance of *Drosophila* to lead // PLoS ONE. – 2012. – Vol.7 (3). – P. 1–7. – doi: 10.1371/journal.pone.0032643.
- Weinert L.A., Araujo-Jnr E.V., Ahmed M.Z., Welch J.J. The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods // Proc. R. Soc. B Biol. Sci. – 2015. – Vol.282. – P. 3–8. – doi: 10.1098/rspb.2015.0249.
- Werren J.H., Baldo L., Clark M.E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology // Nature Reviews Microbiol. – 2008. – Vol.6 (10). – P. 741–751. – doi: 10.1038/nrmicro1969.
- Zilber-Rosenberg I., Rosenberg E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution // FEMS Microbiology Reviews. – 2008. – Vol.32 (5). – P. 723–735. – doi: 10.1111/j.1574-6976.

Представлено: О.М.Вайсерман / Presented by: A.M.Vaiserman

Рецензент: В.Ю.Страшнюк / Reviewer: V.Yu.Strashnyuk

Подано до редакції / Received: 15.03.2016