

**РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГАПЛОТИПОВ мтДНК
В ПОПУЛЯЦИЯХ *DROSOPHILA
MELANOGASTER* УКРАИНЫ**

А.И. Рожок, С.В. Серга, С.В. Демидов, И.А. Козерецька
Киевский национальный университет им.Тараса Шевченко

Вступление

Drosophila melanogaster является крайне оседлым видом с радиусом разлета от места появления имаго, редко превышающим 150-200 метров. Тем не менее, этот вид на сегодня стал космополитным, развившись в Африке (Lachaise et al. 1988) и распространившись с развитием международного торгового судоходства (Johnson 1913). Однако, детальное исследование процесса распространения вида стало возможным только с появлением молекулярно-биологических методов, и интерес к этому вопросу возрос в связи с обнаружением неестественно быстрого распространения некоторых элементов генома, таких как Р транспозон (Kidwell 1983), в популяциях *D. melanogaster* по всему миру.

Типирование мтДНК проводят в основном по двум генам - гену цитохром С оксидазы I субъединицы (COI) и гену NADH dehydrogenase (ND1). При этом выделяют несколько гаплотипов в зависимости от последовательности данных генов, которые могут не совпадать при типировании двумя указанными генами. Наибольшее разнообразие гаплотипов мтДНК по гену I субъединицы цитохромоксидазы было обнаружено в линиях из природных популяций в Европы (Nunes et al. 2008). В этом же исследовании было показано, что распространение гаплотипов сильно отклоняется от ожидаемого, если бы их распространение отвечало модели эволюционного процесса расселения вида. Среди 18 гаплотипов, обнаруженных в линиях, собранных по всему миру, в этом исследовании, самым распространенным оказался гаплотип 2, который встречается на всех

континентах, где встречается *D. melanogaster*. В такой ситуации наличие большого числа гаплотипов на фоне повсеместного распространения одного из них свидетельствует о чрезвычайно быстром недавнем распространении последнего.

Было показано (Nunes et al. 2008), что с гаплотипом 2 ассоциирован определенный генотип бактерии *Wolbachia* (штамм *wMel* генотип *wMel*), которая является широко распространенным внутриклеточным эндосимбионтом многих беспозвоночных. На сегодняшний день показано также чрезвычайную распространенность данной бактерии в природных популяциях *D. melanogaster* (Werren et al., 1995; Werren, 1997; Hilgenboecker et al., 2008), причины и механизмы которой остаются загадкой. *D. melanogaster* инфицируют два штамма - *roscop* и *wMel*, но в природных популяциях встречается только последний, что свидетельствует об однородности инфекции. В то же время бактерий данного штамма удалось разделить по нескольким переменным локусам на 5 генотипов. При этом наиболее распространенными в природных популяциях всего мира являются два - *wMel* и *wMelCS*. (Riegler et al. 2005) Кроме того, анализ генотипов бактерии, инфицирующих линии, собранные в различные годы по всему миру, показал, что произошло замещение генотипа *wMelCS* генотипом *wMel*. Глобальное распространение последнего генотипа *Wolbachia* датируется серединой XX столетия и совпало с распространением у *D. melanogaster* Р транспозона (Riegler et al. 2005; см. также Kidwell, 1983). Поскольку этот генотип *Wolbachia* также ассоциирован с популяциями *D. melanogaster*, для которых характерно наличие большого числа копий Р транспозона (Riegler et al. 2005), просматривается некая потенциальная связь между распространением мух с гаплотипом 2, генотипа *Wolbachia wMel* и Р транспозона.

В популяциях *D. melanogaster* Украины как минимум Р транспозон является относительно недавним приобретением генома, первые сведения о котором датируются не далее как серединой 80-х годов XX столетия (Захаров, 1984; Anxolabehere et al. 1985; Ronsseray et al. 1989). Наличие и повсеместное распространение этого транспозона в популяциях *D. melanogaster*

Украины было также подтверждено и более недавними исследованиями (Коваленко и др. 2006; Rozhok et al. 2009).

В данной работе определяли гаплотипы мтДНК шести популяций *D. melanogaster* с целью обнаружения, в частности, гаплотипа 2 как возможного вектора распространения Р транспозона и бактерии *Wolbachia* в популяции *D. melanogaster* Украины.

Материалы и методы исследования

Плодовых мушек собирали в природе в августе 2010 года и вели в культуре как изосамковые линии (David et al. 2005). В анализ были включены 6 популяций (из Чернобыльской зоны отчуждения - с. Полесское, водоем-охладитель ЧАЭС и г. Чернобыль, а также города Харьков, Умань, Магараж и Одесса). Для анализа мтДНК отбиралось потомство 3 изосамковых линий каждой исследуемой популяции, из которого выделяли тотальную ДНК (потомство каждой изосамки отдельно), используя DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, США) согласно протоколу производителя.

Для определения гаплотипа была избрана последовательность ДНК гена первой субъединицы цитохром С оксидазы, которую нарабатывали с помощью ПЦР как описано в Nunes et al. (2008). Нароботанные фрагменты были очищены с помощью Gel Extraction Kit ("Qiagen", США) и отсековированы в Университете Южной Каролины, США. Полученные последовательности мтДНК анализировали в пакете программ VectorNTI (Invitrogen, США). Проводилось множественное выравнивание (алгоритм ClustalX) с известными последовательностями гаплотипов по этому же гену из базы данных GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; идентификационные номера этих последовательностей см. в Nunes et al. 2008).

Полученные результаты и их обсуждение

Среди гаплотипов мтДНК, обнаруженных нами в популяциях *D. Melanogaster* Украины, присутствуют как гаплотипы, ранее обнаруженные Nunes et al. (2008) в других частях света, так и ранее не описанные. Последние, по-видимому, представлены у особей, которые имеют местное происхождение, хотя это предположение требует доказательств в виде более детальной и масштабной картины распределения гаплотипов в

Восточной Европе и на Ближнем Востоке. Особи с гаплотипами, отличными от ранее известных по Nunes et al. (2008), были обнаружены в популяциях г. Чернобыля и г. Умани.

Распределение обнаруженных нами гаплотипов по территории Украины из числа ранее описанных Nunes et al. (2008) представлено на Рис. 1.

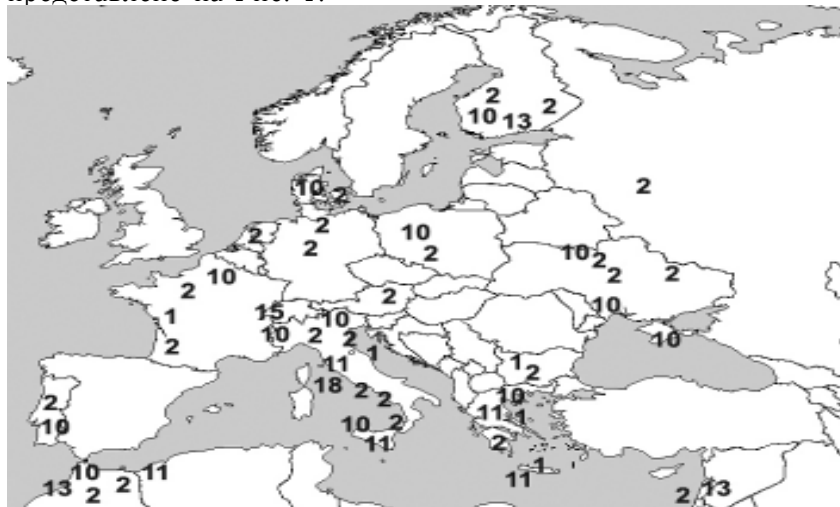


Рис.1. Распределение гаплотипов мтДНК в популяциях *D.melanogaster* Украины (нумерация гаплотипов и данные вне Украины по Nunes et al. 2008).

Как демонстрирует Рис. 1, было обнаружено наличие двух ранее описанных в Европе гаплотипов мтДНК в популяциях *D. melanogaster* Украины - это гаплотипы 2 и 10 (2 - популяции в районе водоема-охладителя ЧАЭС, с. Полесского и г. Харькова; 10 - г. Магарач, г. Одесса и тот же водоем-охладитель). Также данные представленные на рис. 1 позволяют сделать вывод (данные вне Украины взяты из дополнительных материалов Nunes et al. 2008), что оба упомянутых гаплотипа достаточно широко распространены в Европе, а распространение гаплотипа 10 в основном ограничено территорией Европы (данные по миру не показаны).

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что популяции *D. melanogaster* Украины в некоторой степени разнородны по своему происхождению и состоят как из особей,

имеющих, по-видимому, местное происхождение (относительно недавнего времени), так и из недавних иммигрантов из Европы, представленных в украинских популяциях как минимум гаплотипами 2 и 10. Интересно, что Nunes et al. (2008) показали наибольшую ассоциированность генотипа *Wolbachia* wMel именно с этими гаплотипами *D. melanogaster*. Широкомасштабного генотипирования *Wolbachia* в популяциях *D. melanogaster* Украины по нашим сведениям ранее не проводилось. Но интересно, что генотип wMel был найден в популяции г. Умани (Илинский и Захаров, 2007). Согласно последней работе, этот генотип инфицировал в основном особей с гаплотипом, отличным от приведенных в Nunes et al. (2008). Тем не менее, это исследование показало сам факт наличия этого генотипа в украинских популяциях. Таким образом, полученные нами данные в контексте результатов Nunes et al. (2008) и Илинского и Захарова (2007) свидетельствуют, что быстрое распространение гаплотипа 2 и 10 в Европе, описанное Nunes et al. (2008), возможно затронуло и украинские популяции *D. melanogaster*. Вместе с особями-носителями этих гаплотипов на территорию Украины могла попасть и ассоциированная с ними *Wolbachia* ripientis генотипа wMel, поскольку вытеснение этим генотипом других в глобальном масштабе было ранее показано (Riegler et al. 2005).

Поскольку Р транспозон также появился в украинских популяциях лишь чуть более четверти столетия назад и за нашими данными (Rozhok et al. 2009) является идентичным известным последовательностям Р транспозона *D. melanogaster* из других популяций мира, есть основания предполагать, что этот мобильный элемент генома мог тоже быть привнесен в украинские популяции с иммигрирующими особями, в частности носителями гаплотипов 2 и 10. Однако, это предположение еще требует доказательств.

Благодарности. Авторы выражают благодарность проф. Г. Милюневскому (КНУ имени Тараса Шевченко) и снс И. Чижевскому (Экоцентр Чернобыльской зона отчуждения), сотрудникам биологического факультета Одесского национального университета имени И. Мечникова и Института винограда и вина "Магарач" за помощь в сборе материала. Также авторы благодарны проф. Т. Муссо (Университет Южной Каролины) за помощь в секвенировании.

Литература

1. Поведение транспозонов *hobo* и *P* в нестабильной линии *yellow²⁻⁷¹⁷ Drosophila melanogaster* и ее производных после скрещиваний с лабораторной линией / Л.В. Коваленко, Л.П. Захаренко, М.А. Волошина, Т.В. Карамышева [и др.] // *Генетика*. - 2006. - № 42. - С. 605-612.
2. Захаров И.К. Роль *P*- и *M*-цитотипов в контроле мутирования нестабильных аллелей гена *singed* у *Drosophila melanogaster* / И.К. Захаров // *Генетика*. - 1984. - № 20. - С. 42-50.
3. Илинский Ю.Ю. Характеристика инфицированности цитоплазматическим эндосимбионтом *Wolbachia* в популяции *Drosophila melanogaster* Умани / Ю.Ю. Илинский, И.К. Захаров // *Доклады Академии Наук*. - 2007. - № 413. - С. 1-3.
4. *P* element distribution in Eurasian populations of *Drosophila melanogaster*: a genetic and molecular analysis / D. Anxolabehere, D. Nouaud, G. Periquet, P. Tchen // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. - 1985. - Vol. 82. - P. 5418-5422
5. Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative trait analysis in natural populations / J.R. David, P. Gibert, H. Legout [et al.] // *Heredity*. - 2005. Vol. 94. - P. 3-12.
6. How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data / K. Hilgenboecker, P. Hammerstein, P. Schlattmann [et al.] // *FEMS Microbiol. Lett.* - 2008. - Vol. 281. - P. 215-220.
7. Johnson C.W. The distribution of some species of *Drosophila* / C.W. Johnson // *Psyche*. - 1913. - Vol. 20. - P. 202-204.
8. Kidwell M.G. Evolution of hybrid dysgenesis determinants in *Drosophila melanogaster* / M.G. Kidwell // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1983. - Vol. 80. - P. 1655-1659.
9. Historical biogeography of the *Drosophila melanogaster* species subgroup / D. Lachaise, M.L. Cariou, J.R. David [et al.] // *Evol. Biol.* - 1988. - Vol. 22. - P. 159-225.
10. Nunes M.D.S. Nonrandom *Wolbachia* infection status of *Drosophila melanogaster* strains with different mtDNA haplotypes / M.D.S. Nunes, V. Nolte, C. Schlotterer // *Mol. Biol. Evol.* - 2008. - Vol. 25. - P. 2493-2498.

11. Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster* / M. Riegler, M. Sidhu, W.J. Miller, S.L. O'Neill // *Curr. Biol.* - 2005. - Vol. 15. - P. 1428-1433.

12. Ronsseray S. Copy number and distribution of P and I mobile elements in *Drosophila melanogaster* populations / S. Ronsseray, M. Lehmann, D. Anxolabehere // *Chorosoma (Berl)*. - 1989. - Vol. 98. - P. 207-214.

13. Occurrence of P element in natural populations of *Drosophila melanogaster* in Ukraine / A. Rozhok, O. Bilousov, O.V. Protsenko [et al.] // *Dros. Inf. Serv.* - 2009. - Vol. 92. - P. 73-78.

14. Werren J.H. Distribution of *Wolbachia* in neotropical arthropods / J.H. Werren, L. Guo, D.W. Windsor // *Proc. R. Soc. Lond. B.* - 1995. - Vol. 262. - P. 174-204.

15. Werren J.H. Biology of *Wolbachia* / J.H. Werren // *Annu. Rev. Entomol.* - 1997. Vol. 42. - P. 587-609.

Резюме

Рожок А.И., Серга С.В., Демидов С.В., Козерецька И.А. *Распространение гаплотипов мтДНК в популяциях *Drosophila melanogaster* Украины.*

Реконструкция процесса распространения по миру плодовых мушек *Drosophila melanogaster* по митохондриальным генам позволила обнаружить некоторые интересные закономерности, свидетельствующие, в частности, о возможных путях расселения внутриклеточных эндосимбиотических бактерий рода *Wolbachia* и, возможно, Р транспозона у этого вида двукрылых насекомых. В наших предыдущих исследованиях мы обнаружили присутствие как Р транспозона, так и бактерии *Wolbachia* в популяциях *D. melanogaster* Украины. Р транспозон является относительно недавним приобретением геномов украинских популяций, и остаются невыясненными пути его миграции на территорию Украины, то же касается и эндосимбионта *Wolbachia*. В настоящей работе мы проанализировали последовательности гена I субъединицы цитохром С оксидазы в украинских популяциях *D. melanogaster* и обнаружили достаточно разнородное происхождение этих популяций. Тем не менее, мы установили в украинских популяциях наличие гаплотипа 2 мтДНК, который известен тем, что быстро распространился по популяциям мира и ассоциируется с конкретным генотипом *Wolbachia*. На основании полученных данных и данных из литературы, мы предполагаем, что с распространением гаплотипа 2 возможно связано и распространение бактерий *Wolbachia* и Р транспозона в украинских популяциях *D. melanogaster*.

Ключевые слова: мтДНК, гаплотип, *Drosophila melanogaster*, *Wolbachia*, Р транспозон.

Резюме

Рожок А.І., Серга С.В., Демидов С.В., Козерецька І.А. *Поширення гаплотипів мтДНК в популяціях *Drosophila melanogaster* України.*

Реконструкція процесу поширення по світу плодових мушок *Drosophila melanogaster* за мітохондріальними генами дозволила виявити деякі цікаві закономірності, які свідчать, зокрема, про можливі шляхи розселення внутріклітинних ендосимбіотичних бактерій *Wolbachia* і, можливо, Р транспозона у цього виду двокрилих комах. В наших попередніх дослідженнях ми виявили присутність як Р транспозона, так і бактерій *Wolbachia* в популяціях *D. melanogaster* України. Щонайменше Р транспозон є відносно недавнім набуттям геномів українських популяцій, і залишаються неясними шляхи його міграції на територію України. В даній роботі проаналізовано послідовності гена цитохром С оксидази в українських популяцій *D. melanogaster* та встановлено достатньо різнорідне походження цих популяцій. Між тим, виявлено в українських популяціях наявність наплотипу 2 мтДНК, який відомий тим, що швидко поширився по популяціях світу і асоціюється з конкретним генотипом *Wolbachia*. На основі отриманих даних та даних з літератури, ми припускаємо, що з поширенням гаплотипу 2 можливо пов'язане і поширення бактерій *Wolbachia* і Р транспозона в українських популяціях *D. melanogaster*.

Ключові слова: мтДНК, гаплотип, *Drosophila melanogaster*, *Wolbachia*, Р транспозон.

Summary

Rozhok A.I., Serga S.V., Demydov S.V., Kozeretka I.A. *Occurrence of mtDNA haplotypes in populations of *Drosophila melanogaster* from Ukraine.*

Reconstruction of the process of *Drosophila melanogaster* fruit flies' spread over the world by mitochondrial genes has revealed some interesting patterns providing clues, in particular, to possible ways of the spread of intracellular endosymbiotic bacteria of the genus *Wolbachia* and, perhaps, P transposon in this dipteran species. Our previous studies have shown the presence of both P transposon and *Wolbachia* in *D. melanogaster* populations from Ukraine. At least P transposon is a relatively recent acquisition of the genomes of Ukrainian populations, but the ways of its immigration to Ukraine remain unclear. In the present study, we analyzed the sequences of the cytochrome C oxidase gene in Ukrainian *D. melanogaster* populations and found the populations to be of rather heterogenous origins. Meanwhile, we found the mtDNA haplotype 2 in Ukrainian populations, which is known to have quickly spread in populations all over the world and to be associated with a certain *Wolbachia* genotype. Based on our results and data from literature, we hypothesize that *Wolbachia* and P transposon invasions of Ukrainian *D. melanogaster* populations might have been linked to the spread of haplotype 2.

Key words: mtDNA, haplotype, *Drosophila melanogaster*, *Wolbachia*, P transposon.

Рецензент: д.мед.н., проф. С.М.Смірнов