

БАКТЕРИИ РОДА SPIROPLASMA ИНФИЦИРУЮТ ДВУТОЧЕЧНУЮ БОЖЬЮ КОРОВКУ (*ADALIA BIPUNCTATA* L.) В РОССИИ

© 1998 г. И. А. Захаров, Е. В. Шайкевич, И. И. Горячева

Представлено академиком Ю.П. Алтуховым 31.12.97 г.

Поступило 15.01.98 г.

В 1947 году Я.Я. Лус [1] обнаружил, что в популяциях двуточечной божьей коровки (*Adalia bipunctata* L., Coleoptera, Coccinellidae) в Европейской части СССР встречаются самки, дающие чисто женское потомство или потомство с преобладанием женского пола. Было показано, что признак бессамцовости наследуется по материнской линии, т.е. детерминируется каким-то цитоплазматическим элементом. Только в 1992 г. было выяснено [2], что таким элементом являются трансвариально передающиеся бактерии, которые могут быть элиминированы при скормливание жукам антибиотика тетрациклина.

Анализ ДНК позволил определить систематическое положение выделенных в Англии бактерий – ими оказались риккетсии, близкие к видам *Rickettsia conorii*, *R. canada*, *R. typhi* [3, 4]. Такие же риккетсии были найдены нами в киргизской популяции адалий, принадлежащих к подвиду *A. bipunctata turanica* [5].

Изучение российских популяций дало совсем иные результаты. Самки, приносящие чисто женское потомство, найдены нами в популяциях Москвы и Санкт-Петербурга, причем в последней их доля приближается к 50% всех самок [6]. Признак бессамцовости и в этом случае, однако, мог быть элиминирован тетрациклином, т.е. определялся присутствием какой-то бактерии. Использование специфических для ДНК риккетсий праймеров в полимеразной цепной реакции (ПЦР) показало, однако, что “бессамцовые” самки из Санкт-Петербурга не инфицированы риккетсиями [6]. В настоящей работе для идентификации бактерии, инфицирующей адалии, были применены методы анализа ДНК. С их помощью впервые показано, что жуки из российских популяций, в отличие от популяций Западной Европы, заражены бактерией, принадлежащей к роду *Spiroplasma*.

Коровки *Adalia bipunctata* L. были собраны в Москве (в районе Института общей генетики РАН) и в Санкт-Петербурге (р-н лесопарка Сосновка, сбор любезно предоставлен нам С.О. Сергиевским). Результаты определения половых соотношений в потомстве отдельных самок московской популяции представлены нами в другой работе. Среди 51 изученной самки были обнаружены 3, давшие чисто женское потомство. В табл. 1 показано наследование в последовательных поколениях одной из выделенных линий, И12, признака бессамцовости и связанного с ним признака гибели половины яиц (яйца, содержащие зародыши мужского пола, не развиваются и остаются желтыми, в то время как зародыши женского пола развиваются и яйца в процессе их развития сереют).

Из жуков размножаемой в лаборатории линии И12 и из жуков, собранных в природе, была выделена ДНК по методу Д.В. Муха (ИОГен РАН). Для этого жуков предварительно замораживали при температуре -20°C на ночь. Отрезали крылья и надкрылья. Туловище растирали в эппендорфской пробирке в лизирующем растворе, содержащем 0.1 М ЭДТА, 5 млМ trisHCl pH 8.0, 0.75 М NaCl. К суспензии добавляли SDS до 1%. Смесь инкубировали 1 ч при температуре 65°C , затем добавляли 1/7 объема 10 М ацетата калия, перемешивали и инкубировали 30 мин при температуре 0°C . Центрифугировали 10 мин при 8.000 g. К супернатанту добавляли равный объем хлороформа, центрифугировали 10 мин при 8.000 g. К супернатанту добавляли 2.5 объема спирта.

Таблица 1. Наследование признака бессамцовости в линии И12

Поколение	Число яиц	% желтых яиц	Всего потомков	Из них самок	Из них самцов
1	126	61	16	16	0
2	37	49	7	7	0
3	103	53	10	10	0

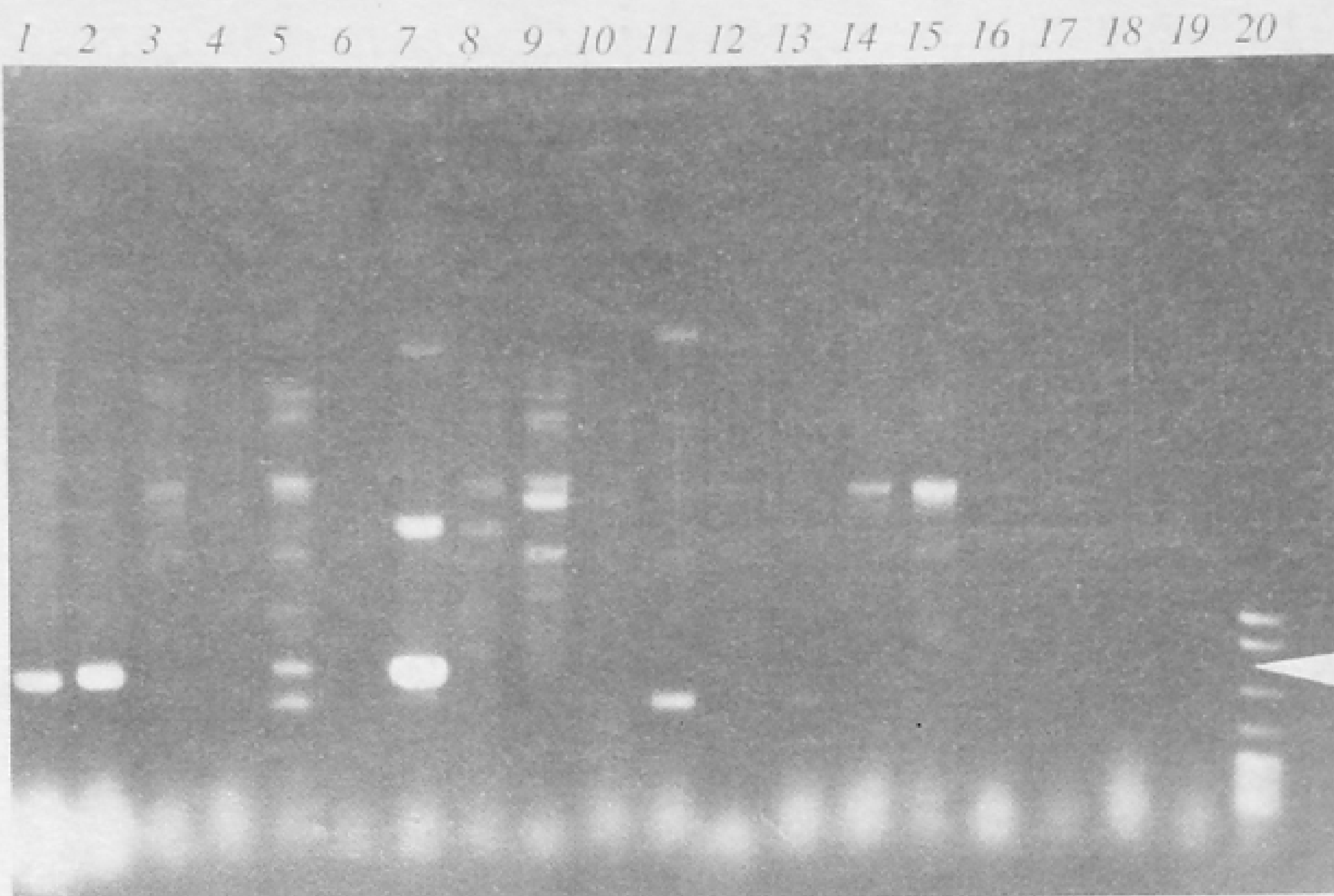


Рис. 1. Выявление бактериальной ДНК в тотальной ДНК, изолированной из жуков Московской популяции *Adalia bipunctata* (амплификация фрагмента бактериального гена малой субъединицы 16S РНК). Электрофорез продуктов амплификации: 1, 2 – две особи линии И12; 3–19 – особи московской популяции; 20 – маркеры молекулярной массы – фрагменты ДНК плазмиды pBR322 после обработки рестриктазой *MspI*.

Осаждали при 10.000 g 10 мин. Осадок ДНК растворяли в 50 мкл стерильной воды. В реакцию амплификации брали по 0.2–0.4 мкг полученного неочищенного препарата ДНК.

ПЦР проводили, используя праймер MGSO 5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTGAACCTC-3' [7], который в паре с универсальным прямым праймером (5'-GCTCAACCCCTAACCGCC-3') является специфичным для генов малой субъединицы 16S РНК бактерий класса Mollicutes [7] и дает амплифицированный продукт размером 429 п. н. Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе "Термостат программируемый" (г. Тула) с использованием термофильной ДНК-полимеразы из *Thermus aquaticus* (Taq-полимеразы, БИОН). Реакцию проводили в объеме 40 мкл, используя так называемый "Hot Start" (горячий старт ПЦР). Для повышения чувствительности и специфичности амплификации применяли способ разделения компонентов реакционной смеси до начала процесса ПЦР, используя специальное парафиновое масло "DinOil" как барьер, разделяющий смесь на две неактивные части: внизу – ДНК (0.2–0.4 мкг), нуклеотиды (по 0.2 млМ каждого); сверху – буфер, содержащий 1.5 млМ Mg^{2+} , праймеры (0.1 мкг), Taq-полимеразу (5 ед.) и воду. При высокой температуре 75–80°C парафиновый слой плавится и всплывает, а две искусственно разделенные фазы реакционной смеси перемешиваются и начинается реакция амплификации.

ПЦР проводили при следующих условиях: 30 циклов – денатурация при 94°C 30с, отжиг при 55°C 60 с, синтез при 72°C 60 с. Амплификацию закан-

чивали 6 минутами завершающего цикла при 72°C.

Анализ результатов ПЦР проводили с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле (агароза тип I с низким электроэндоосмосом, Диа-М) при напряжении 5 В/см. Размер продуктов амплификации определяли, сравнивая с маркером молекулярной массы – продуктом расщепления ДНК плазмиды pBR322 рестриктазой *MspI* ("Сибэнзим", Новосибирск).

Нуклеотидную последовательность фрагмента ДНК, полученного в результате ПЦР, определяли по методу Сенгера [8] с использованием Taq-ДНК-полимеразы (Sequencing Grade Taq DNA Polymerase, Promega).

Результаты анализа продуктов ПЦР, полученных путем амплификации ДНК, выделенной из жуков московской популяции, представлены на рис. 1. Препараты ДНК двух особей линии И12 дали в ПЦР характерный фрагмент размером около 420 п. н. Такой же фрагмент был получен при анализе ДНК одной из 12 собранных в Москве самок. При анализе ПЦР-продуктов амплификации ДНК жуков, собранных в Санкт-Петербурге, фрагменты соответствующего размера оказались у 7 из 15 самок (рис. 2).

Для идентификации бактерии, которой инфицированы жуки популяций России, мы определили последовательность нуклеотидов в полученном продукте амплификации ДНК особи линии И12. Сравнение найденной последовательности нуклеотидов с последовательностями генного банка GenBank показало сходство этой последовательности с фрагментом гена 16S РНК бактерий класса

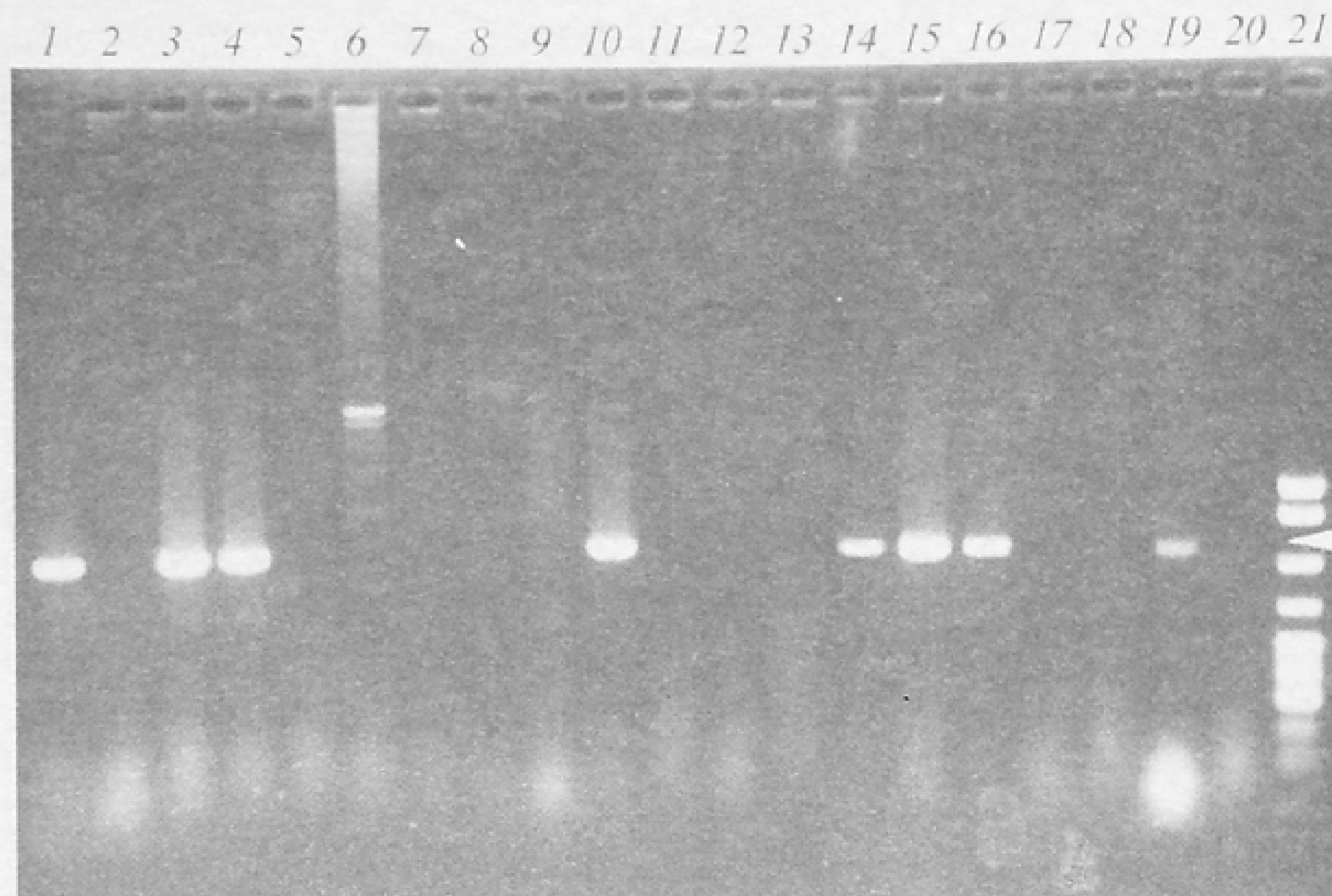


Рис. 2. Выявление бактериальной ДНК в тотальной ДНК, изолированной из жуков *Adalia bipunctata* популяции Санкт-Петербурга. Электрофорез продуктов амплификации: 1–18 – особи петербургской популяции (8, 11, 18 – самцы), 19 – особь из московской популяции, зараженная *Spiroplasma*, 20 – неинфицированная особь, 21 – маркеры молекулярной массы – фрагменты ДНК плазмиды pBR322 после обработки рестриктазой *MspI*.

Ab:	405	CCTAACCGCCTTGGAAACTACATTACTAGAGTATAGGAGAGGTTAGTGGAAATTCATGTG	
Sp. VI:	620	CCNAACCGCCTTGGAAACTACATTACTAGAGTATAGGAGAGGTTAGTGGAAATTCATGTG	
Ab:	345	TAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTAACTGGCCT	
Sp. VI:	680	TAGCGGTGGNATGCGTAGATATATGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTAACTGGCCT	
Ab:	285	ATTACTGACGTTGTGGCACCAGAAAGCGTGGGGAGCAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTC	
Sp. VI:	740	ATTACTGACGTTGTGGCACCAGNAAGCGTGGGGAGCAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTC	
Ab:	225	CACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTTGCCATAAGGCAGTGCTGTAGCTAACGCATTA	
Sp. VI:	800	CACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTTGCCATGAGGCAGTGCTGTAGCTAACGCATTA	
Ab:	165	AGTACTCCGCCTGAGTAGTATGCTCGCAAGA	135
Sp. VI:	860	AGTACTCCGCCTGAGTAGTATGCTNGCAAGA	890

Рис. 3. Последовательность нуклеотидов амплифицированного фрагмента гена малой субъединицы 16S РНК бактерии-симбионта *A. bipunctata* линии И12 (Ab) в сравнении с соответствующей последовательностью *Spiroplasma* VI группы (Sp. VI).

Mollicutes (*Mycoplasma*, *Spiroplasma* и др.). Наибольшее сходство (1 замена на 271 нуклеотид) обнаружено при сравнении нашей последовательности с последовательностью нуклеотидов бактерии *Spiroplasma* группы VI (рис. 3).

Известно, что спироплазмы группы VI являются симбионтами (или паразитами) иксодовых клещей [9]. Зараженность адалий в Москве экзопаразитическими клещами *Succiolipus hippodamiae* [10] указывает на возможное происхождение андроцидной (убивающей самцов) спироплазмы, которую мы нашли у *A. bipunctata*.

Трансовариально наследуемые спироплазмы как агенты, убивающие мужские эмбрионы и, со-

ответственно, вызывающие появление чисто женского потомства, уже 40 лет изучаются у дрозофилы *D. willistoni* и родственных видов [11]. Уникальность явления бессамцовости у адалии состоит в том, что у одного вида хозяина один и тот же эффект (гибель мужского потомства) вызывается в разных популяциях по меньшей мере двумя совершенно различными по систематическому положению бактериями – *Rickettsia* и *Spiroplasma*. Способность убивать только мужские зародыши, не нанося вреда женским, должна иметь в основе какой-то тонкий, пока не расшифрованный, биохимический механизм. Его появление у разных бактерий может быть результатом либо конвергентной эволюции, либо, что кажется более вероятным,

горизонтального переноса некоего генетического детерминанта между неродственными внутриклеточными бактериями.

Авторы благодарны докторам Г.Д.Д. Херсту и М.Э.Н. Межересу (G.D.D. Hurst, M.E.N. Majerus, Кембриджский Университет, Великобритания), Д.В. Муха и Г.О. Шайхаеву за рекомендации, использованные при выполнении настоящей работы.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 96-04-49072, 96-15-97781.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лус Я.Я. // ДАН. 1947. Т. 57. С. 951-954.
2. Hurst G.D.D., Majerus M.E.N., Walker L.E. // Heredity. 1992. V. 69. P. 84-91.
3. Werren J.H., Hurst G.D.D., Wan Zhang et al. // J. Bacteriol. 1994. V. 176. P. 388-394.
4. Balayeva N.M., Ereemeeva M.E., ..., Zakharov I.A. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. P. 1431-1437.
5. Захаров И.А. и др. // Генетика. 1998. Т. 34. № 1. С. 41-45.
6. Захаров И.А., Херст Г.Д.Д., Чернышова Н.Э., Межерес М.Э.Н. // Генетика. 1996. Т. 32. № 11. С. 1504-1509.
7. Kuppeveld F.J.M. et al. // Appl. and Environ. Microbiol. 1992. V. 58. № 8. P. 2606-2615.
8. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 72. P. 5463-5467.
9. Bergey's manual of systematic bacteriology / N.R. Krieg. Ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. V. 1. P. 781-787.
10. Hurst G.D.D., Sharpe R.G., ..., Zakharov I.A. et al. // Ecol. Entomol. 1995. V. 20. P. 230-236.
11. Hurst L.D. // Biol. Rev. 1993. V. 68. P. 121-193.