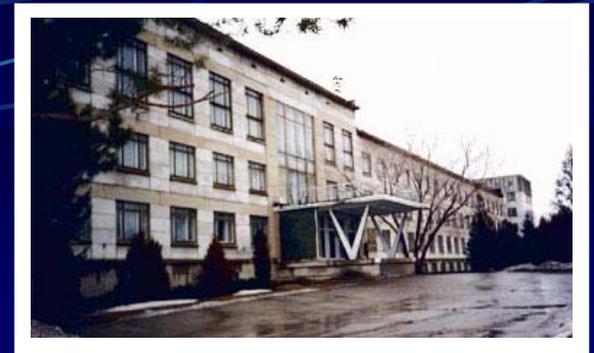


# СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ВОЗМОЖНЫЕ ФУНКЦИИ СИМБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ В ЭМБРИОНАХ И КЛЕТКАХ ЯИЧНИКА *DROSOPHILA*



Воронин Д.А.

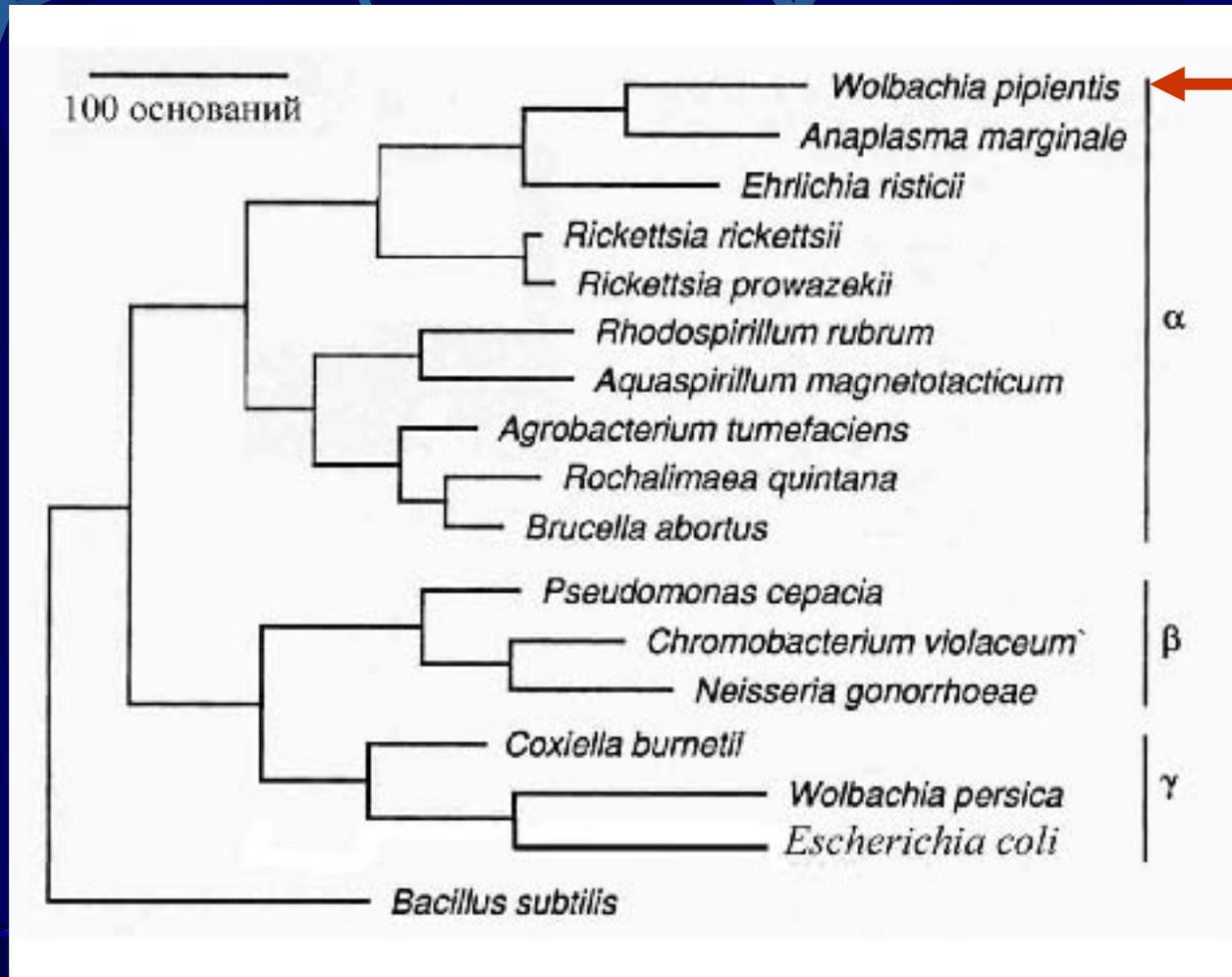
руководитель: к.б.н. Киселёва Е.В.



Институт цитологии и генетики СО РАН

# Эволюционное положение *Wolbachia* среди основных представителей симбиотических бактерий.

Построено на основе анализа последовательностей гена 16S рРНК.



# Изменения репродуктивных функций хозяина, вызываемые *Wolbachia*

Партеногенез

паразитические червей, Hymenoptera,  
трипс, клещ

Феминизация

изоподы, Lepidoptera

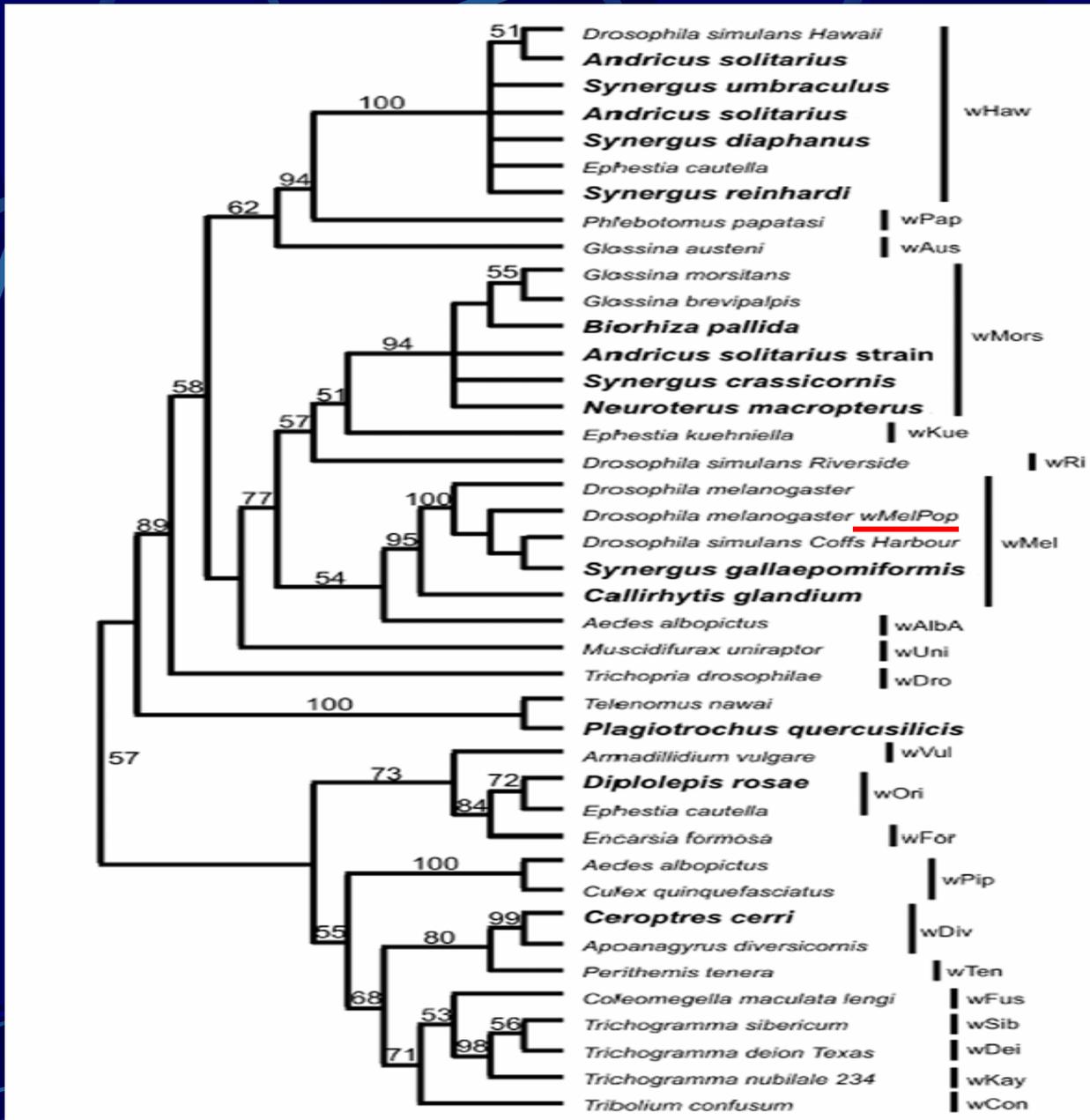
«Гибель самцов»

Coleoptera, Lepidoptera, Diptera

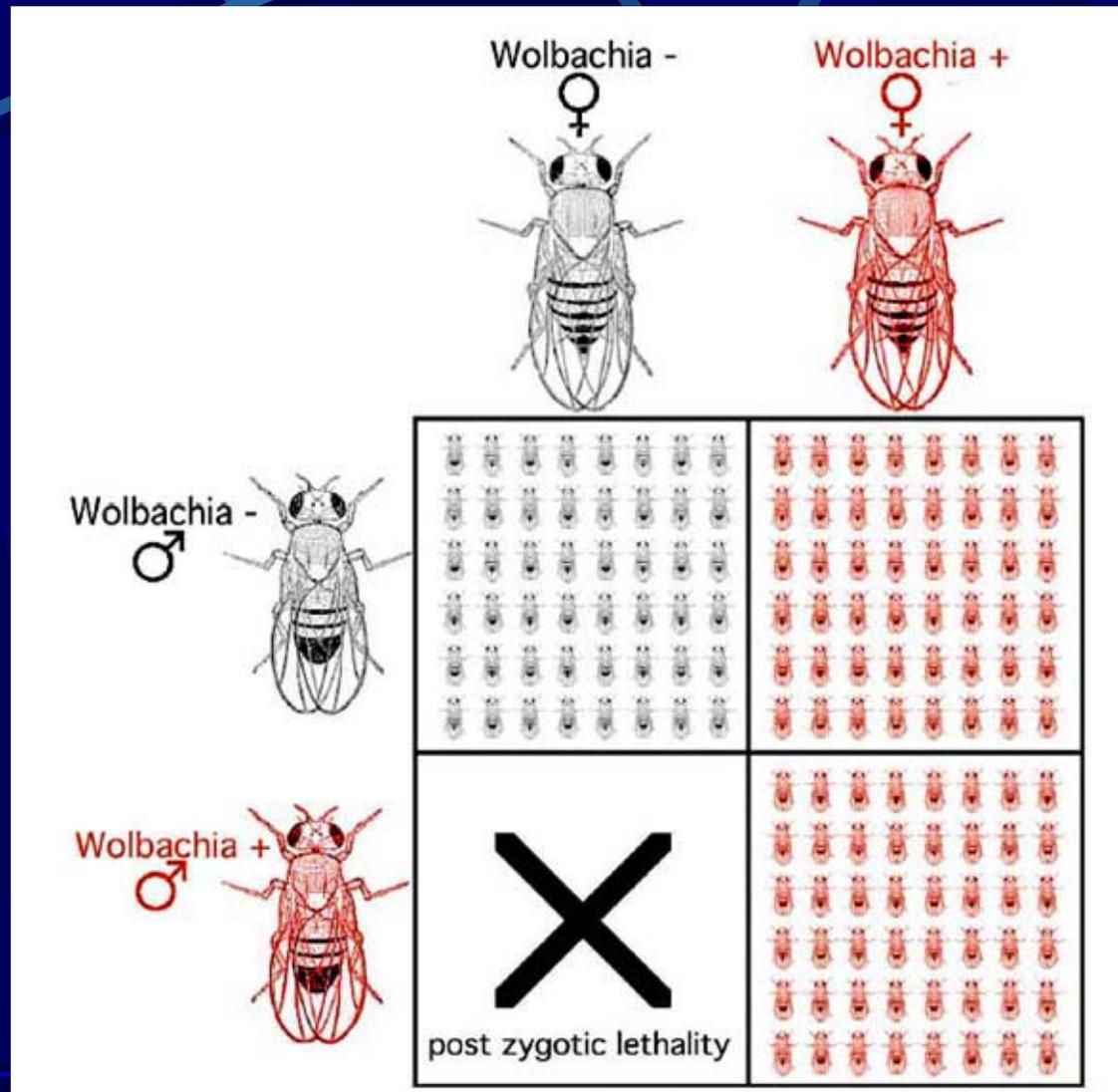
Цитоплазматическая  
несовместимость

во многих видах хозяев

# Филогенетическое древо *Wolbachia*, обнаруженных в разных видах хозяев (Отряд Перепончатокрылые)



# Явление цитоплазматической несовместимости у *Drosophila*, зараженных бактериями wRi



## **Цель**

Исследовать структурную организацию и распределение симбиотических бактерий в эмбрионах и клетках яичника дрозофилы

## **Задачи**

1. Изучить распределение бактерий на разных стадиях раннего эмбриогенеза шести линий дрозофил
2. Выявить особенности структурной организации симбионтов в цитоплазме эмбрионов и клеток яичника шести линий дрозофил
3. Изучить влияние антибиотиков на выживаемость симбионтов в клетках разных линий дрозофил
4. Определить влияние бактерий на выживаемость эмбрионов дрозофил. Оценить уровень цитоплазматической несовместимости при скрещиваниях разных линий дрозофил зараженных симбионтами
5. Исследовать возможные функциональные взаимодействия между симбионтами и внутриклеточными компартментами ранних эмбрионов и клеток яичника дрозофилы

# Виды и линии *Drosophila*

1. *D.simulans* (USA)
2. *D.simulans* (Russia)
3. *D.melanogaster* (Canton S1)
4. *D.melanogaster* (Canton S2)
5. *D.melanogaster* (Curly)
6. *D.virilis*



## Методы

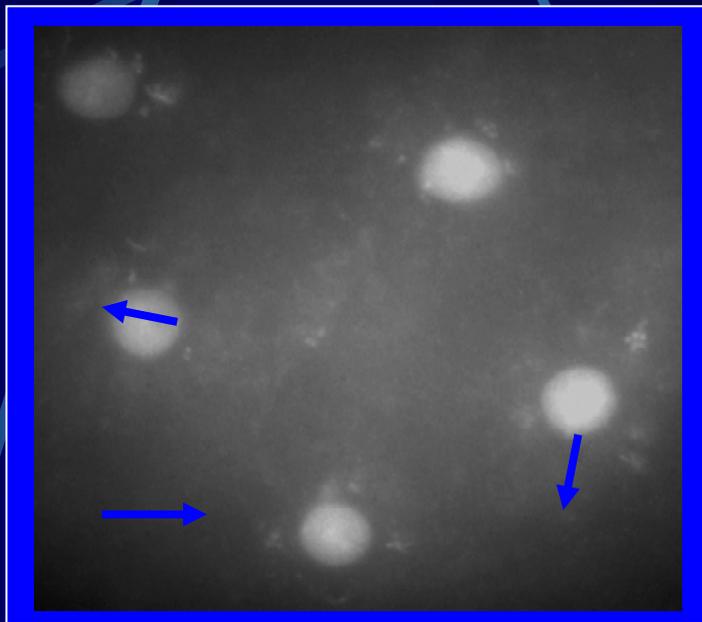
Флуоресцентная микроскопия  
Просвечивающая электронная микроскопия  
ПЦР анализ  
Секвенирование продуктов амплификации  
Общебиологические методы  
(обработка антибиотиками)

Изучить распределение бактерий на разных стадиях раннего  
эмбриогенеза *Drosophila*

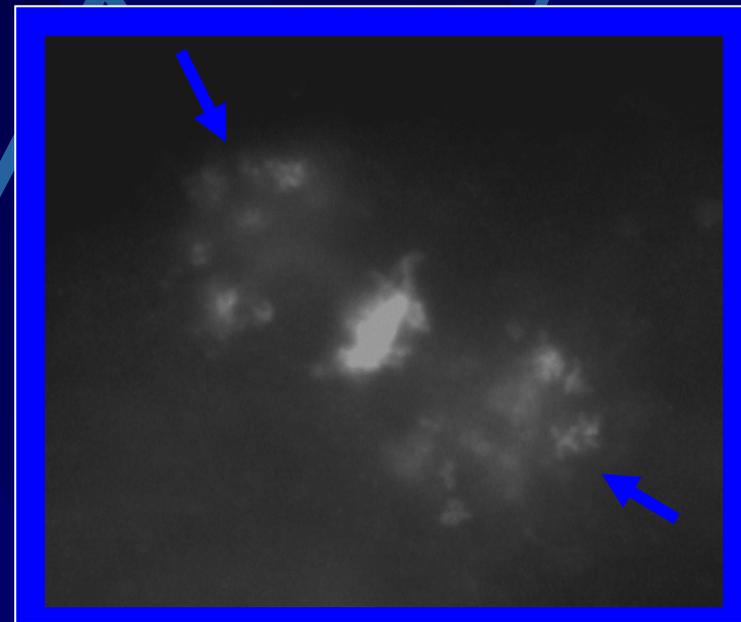
*D. simulans* (U),  
*D. melanogaster* (Canton S1),  
*D. melanogaster* (Curly)

# Локализация ДНК окрашенного (Ноеchst) материала вблизи делящихся ядер на разных стадиях митоза

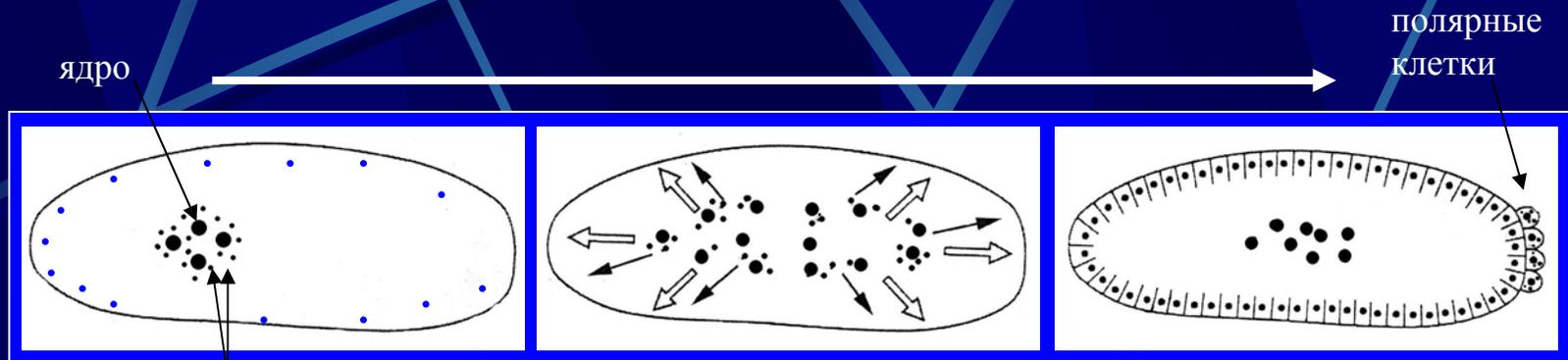
Интерфаза



Метафаза

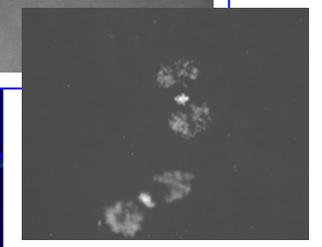
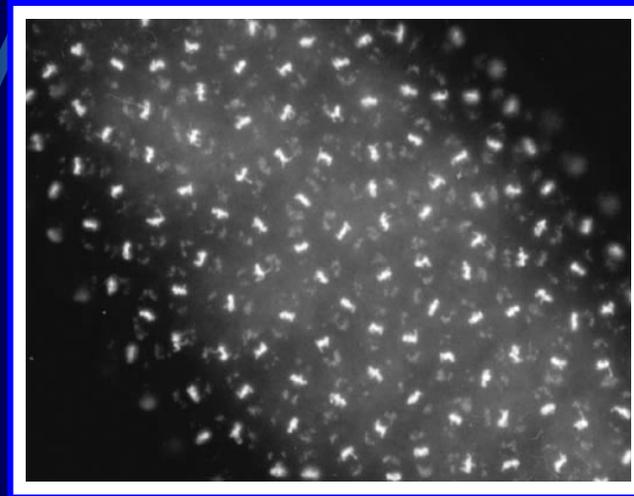
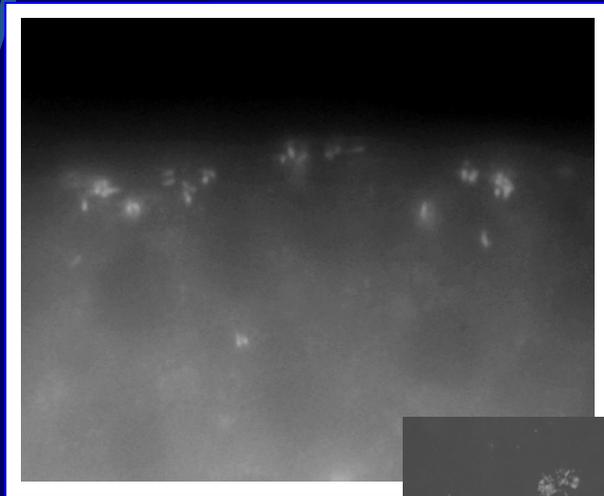


# Распределение бактерий в ранних эмбрионах *Drosophila* на разных стадиях развития



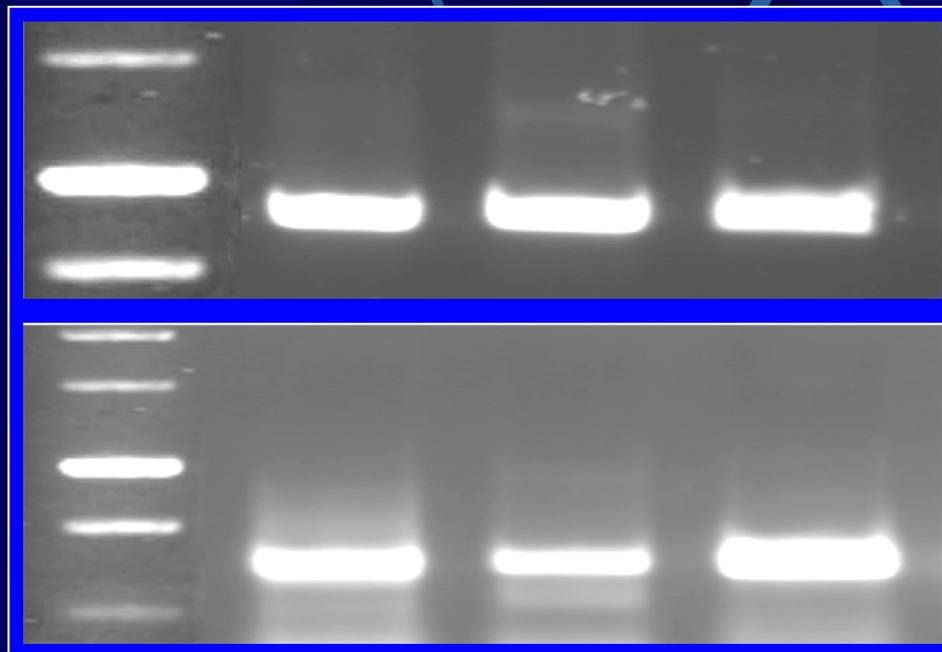
бактерии

полярные  
клетки



ПЦР анализ тотальной ДНК эмбрионов *Drosophila* с *Wolbachia*-специфичными праймерами для 16S rDNA и *wsp*-гена

*D. simulans* (U)      *D. melanogaster*  
Canton S1      Curly



← 910 п.н. (16S рРНК)

← 610 п.н. (*wsp*)

1000 п.н. —  
750 п.н. —  
500 п.н. —

↓  
wRi

↓  
wMel

↓  
wMel

Выявить особенности структурной организации симбионтов в цитоплазме  
эмбрионов и клеток яичника *Drosophila*

*D. simulans* (U)

*D. simulans* (R)

*D. melanogaster* (Curly)

*D. melanogaster* (Canton S1, Canton S2)

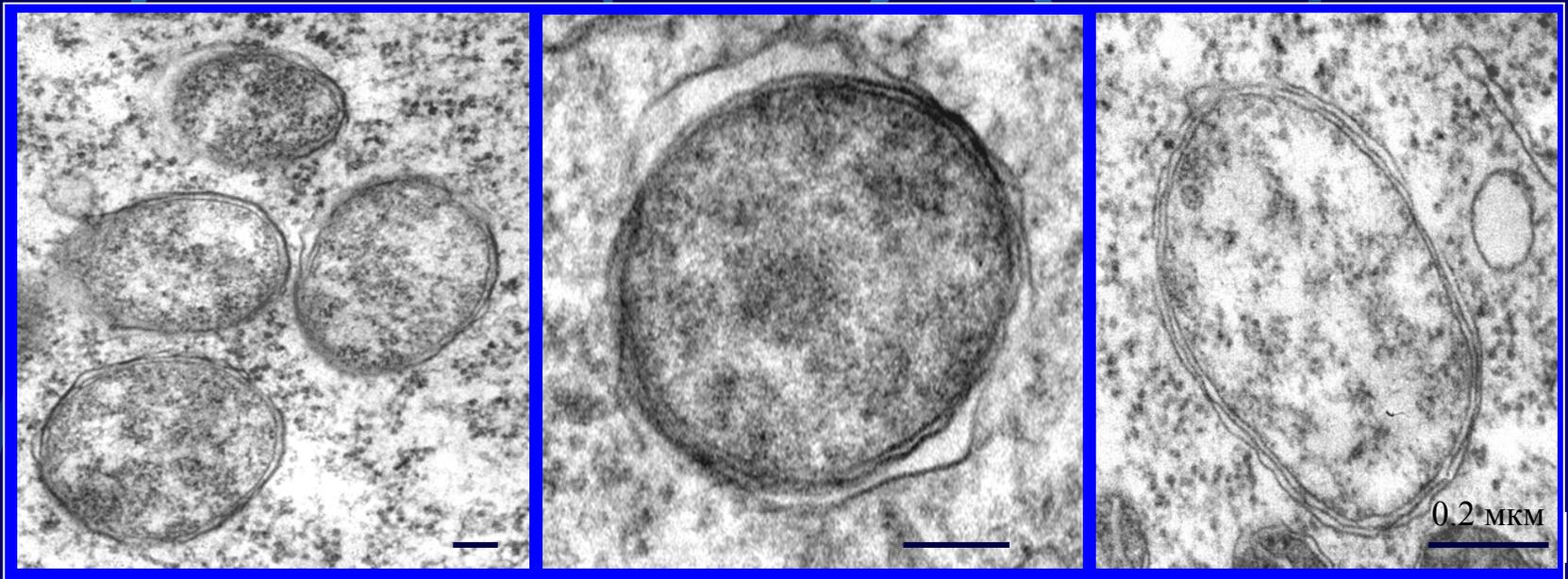
*D. virilis*

*Wolbachia* в цитоплазме ранних эмбрионов  
разных линий *Drosophila*

*D. simulans* (U)

*D. melanogaster*  
Curly

*D. melanogaster*  
Canton S1

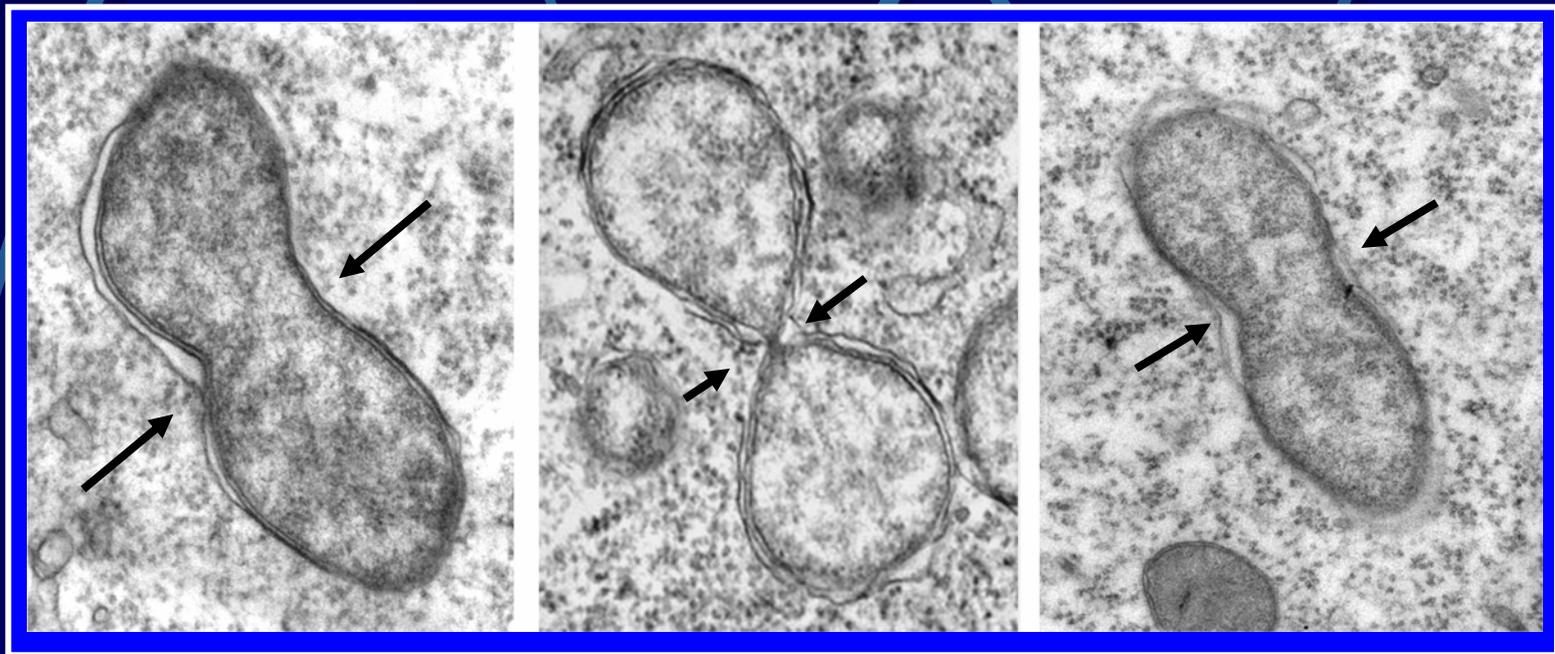


В эмбрионах *Drosophila* бактерии *Wolbachia* активно делятся

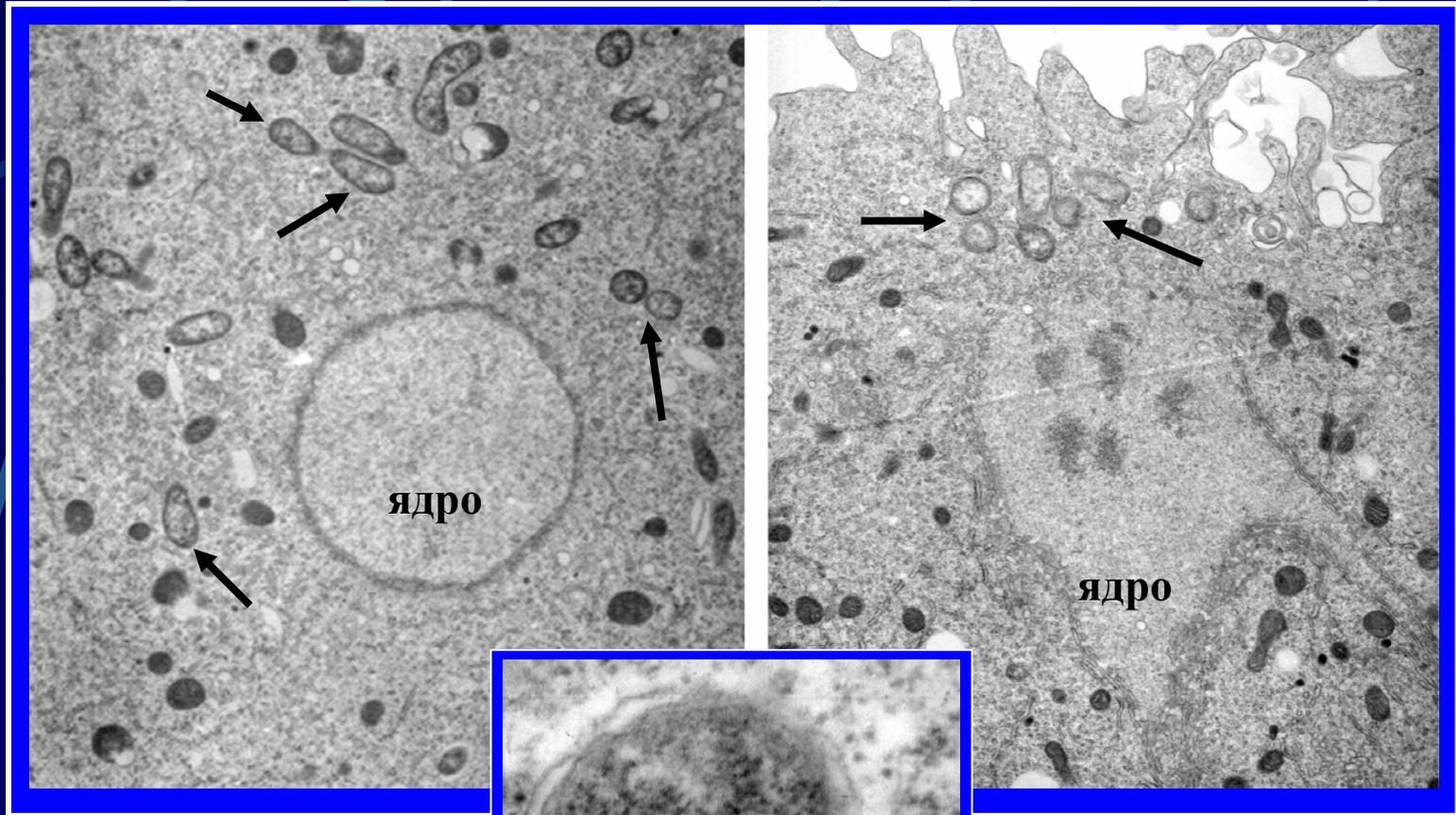
*D. simulans* (U)

*D. melanogaster*  
(Canton S1)

*D. melanogaster*  
(Curly)



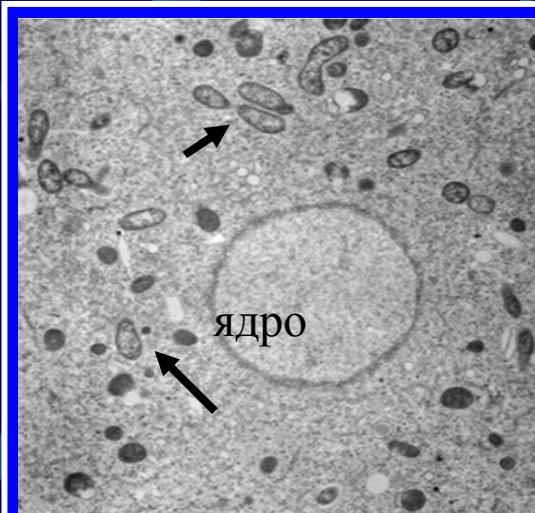
Локализация *Wolbachia* вблизи делящихся ядер  
на разных стадиях митоза (по данным электронной  
микроскопии)



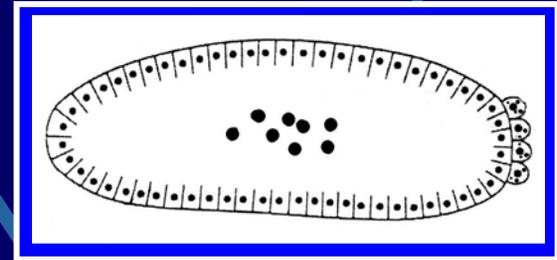
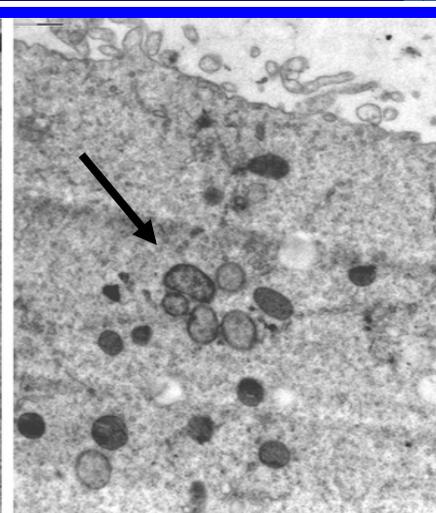
микротрубочка

# Распределение бактерий в ранних эмбрионах *Drosophila* на разных стадиях развития (по данным электронной микроскопии)

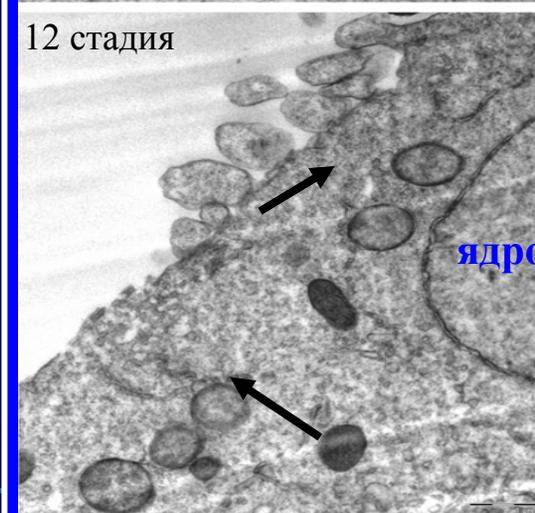
до 9 стадии



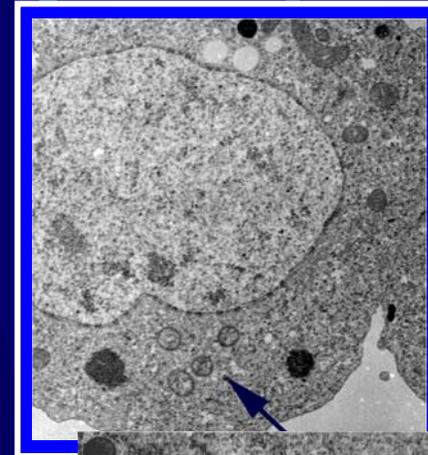
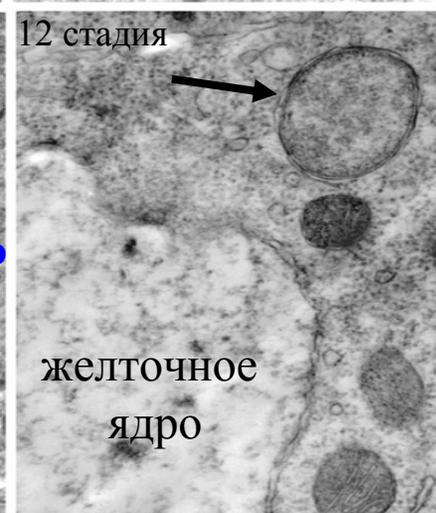
до 9 стадии



12 стадия

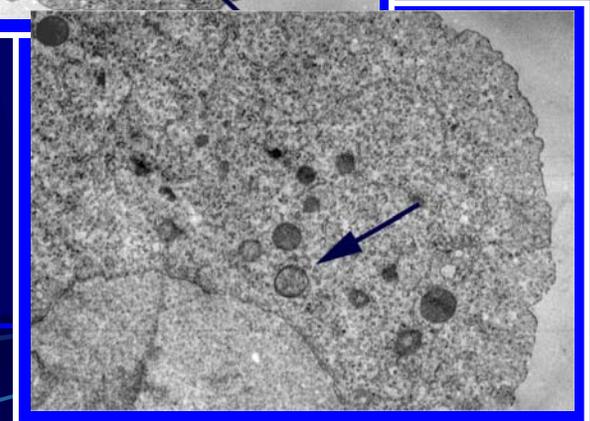


12 стадия



14 стадия

Полярные клетки

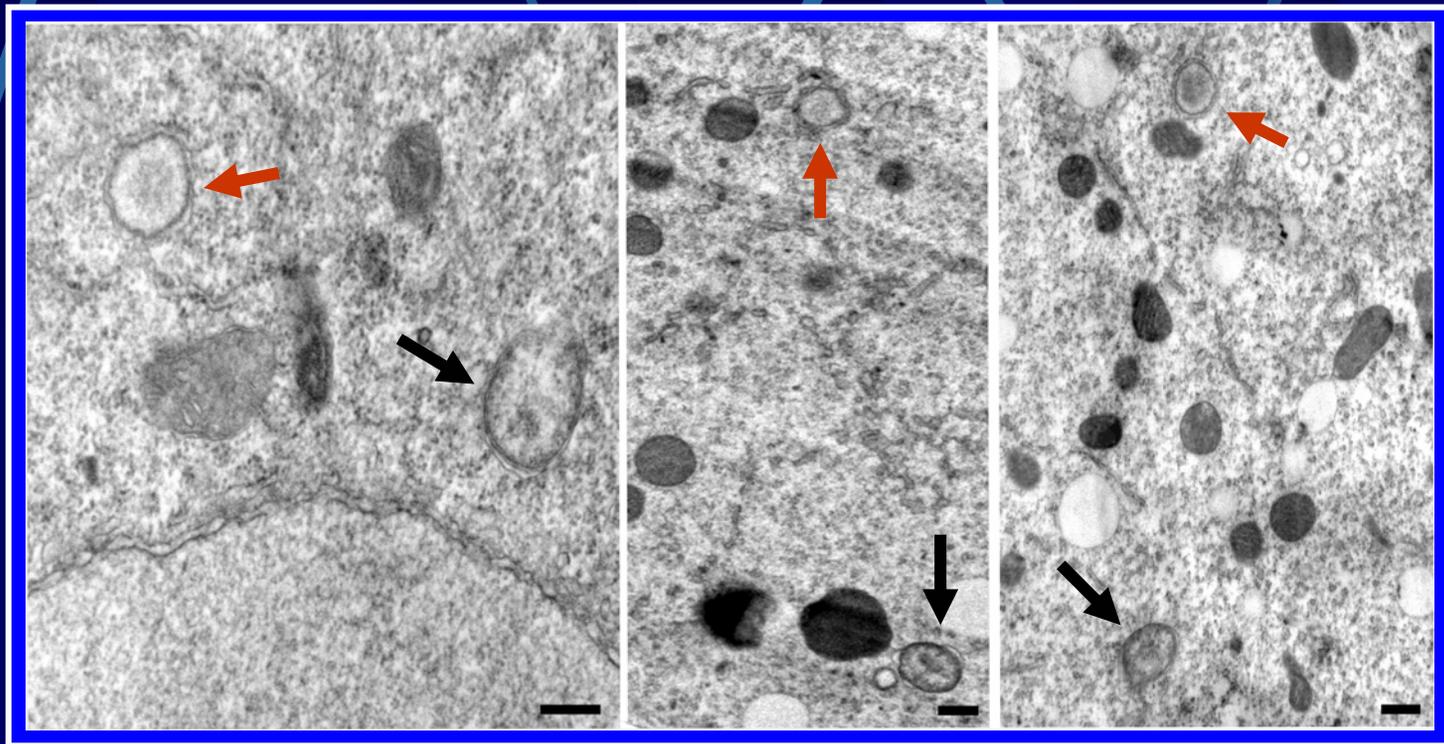


Первый (черные стрелки) и второй (красные стрелки) типы симбионтов найденных в цитоплазме эмбрионов *Drosophila*

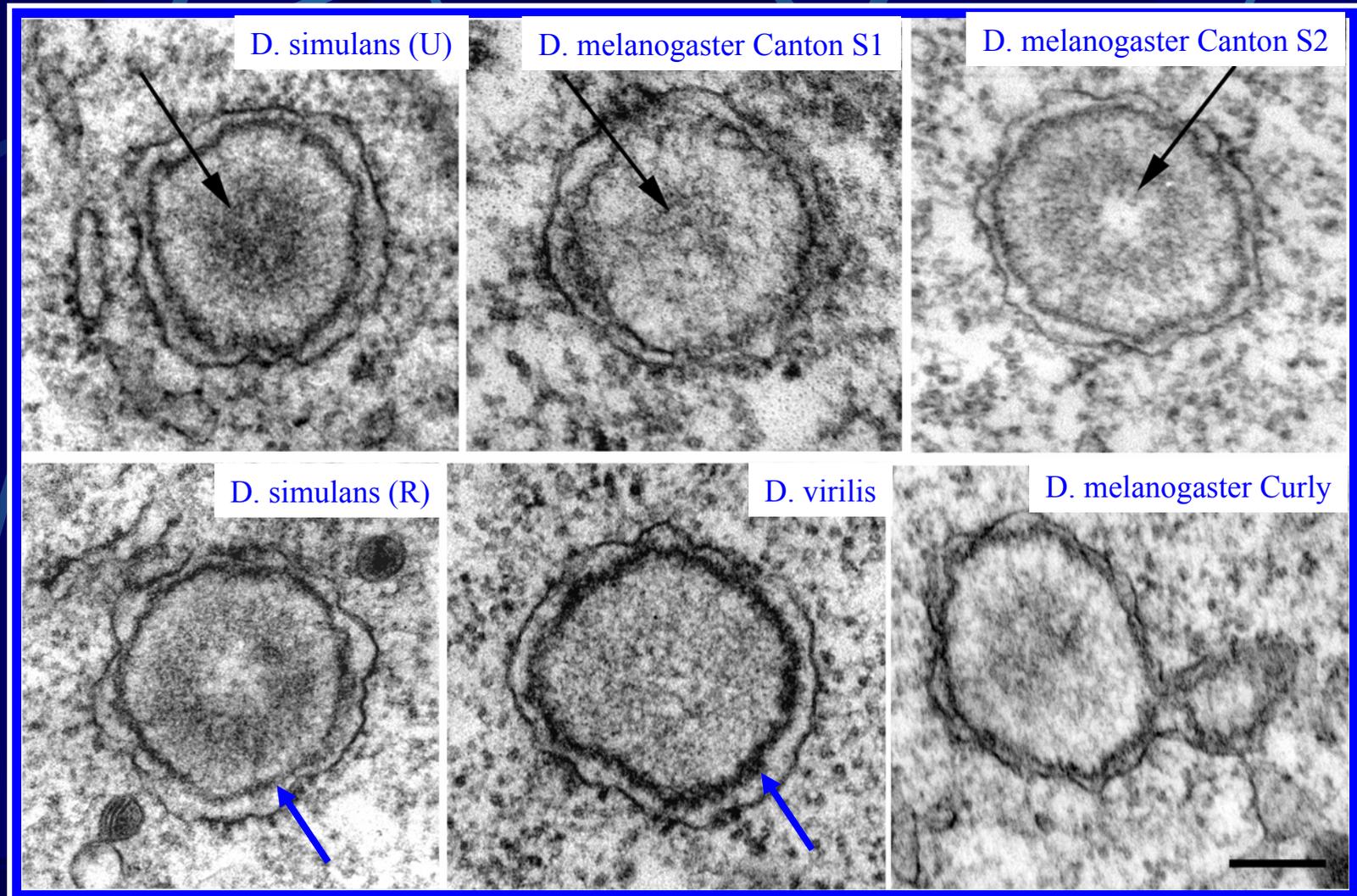
*D. simulans* (U)

*D. melanogaster*  
(Canton S1)

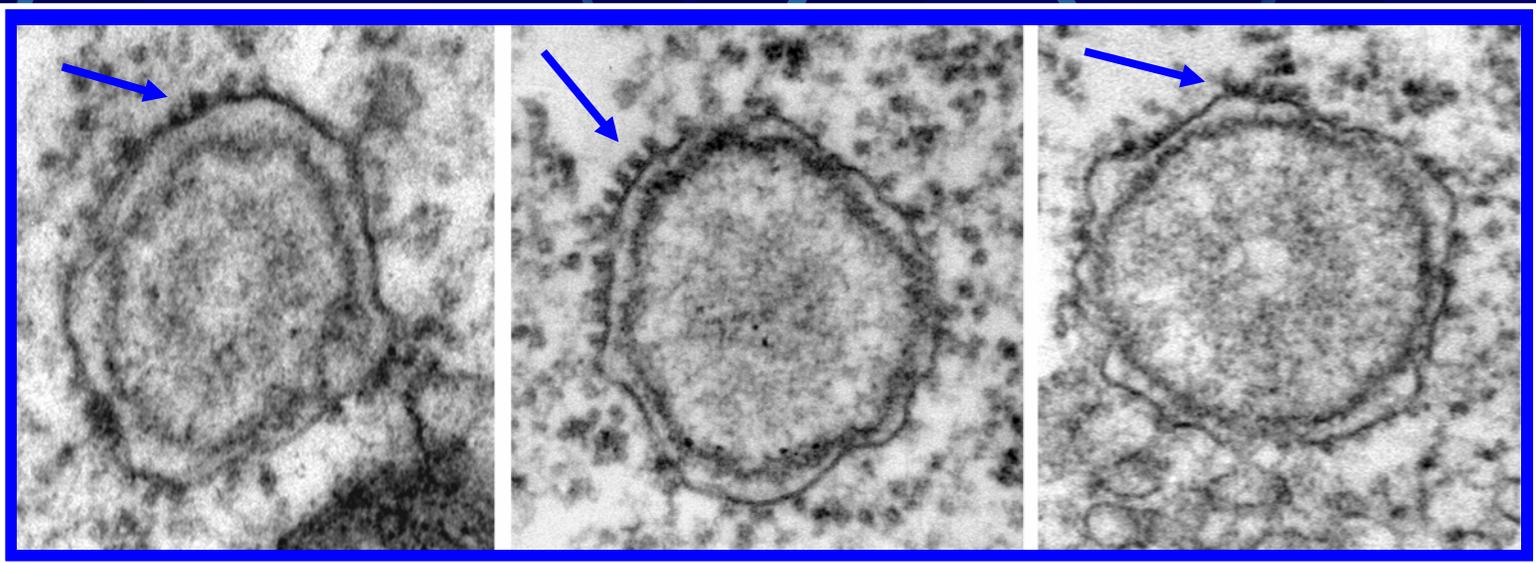
*D. melanogaster*  
(Curly)



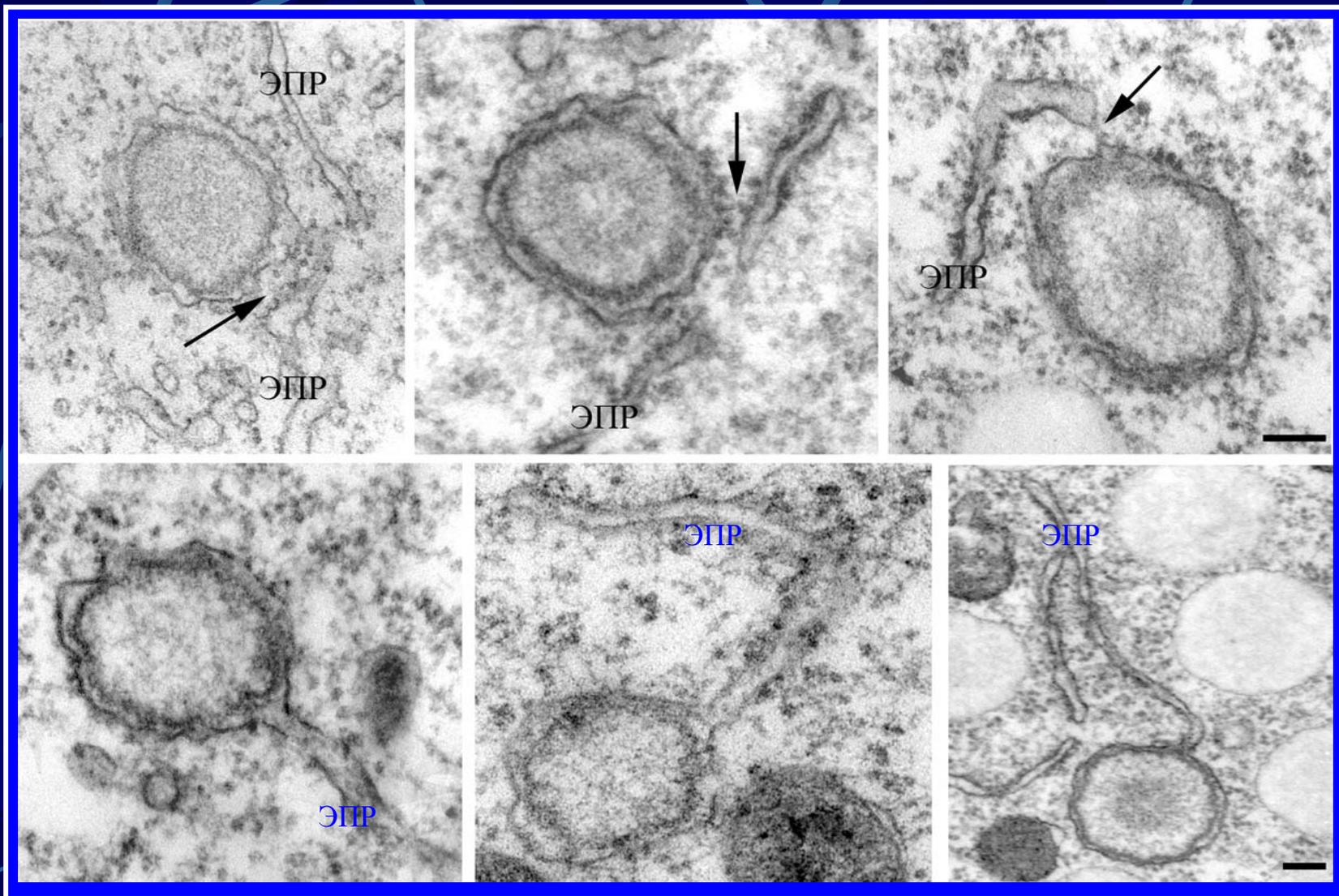
# Морфология необычной формы бактерий в ранних эмбрионах линий *Drosophila*



Второй тип бактерий окружен мембраной, сходной по морфологии с шероховатым эндоплазматическим ретикулумом

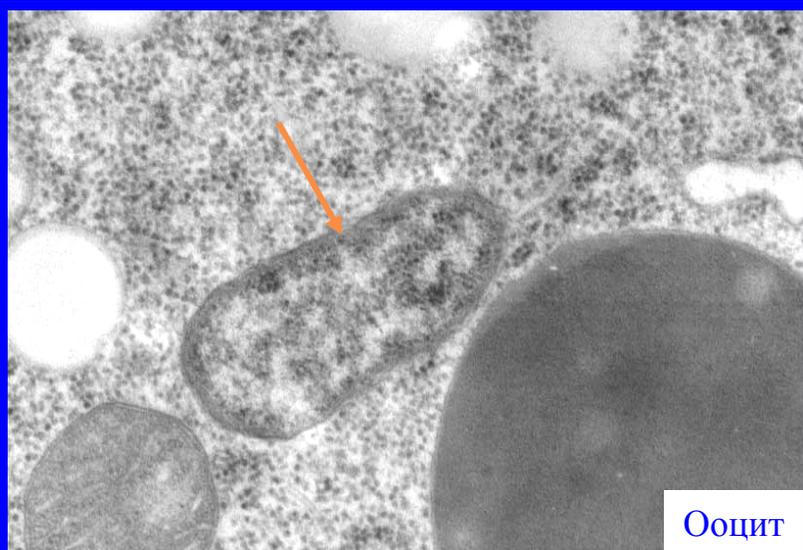


# Наружная мембрана бактерий второго типа контактирует и продолжается в мембраны ЭПР

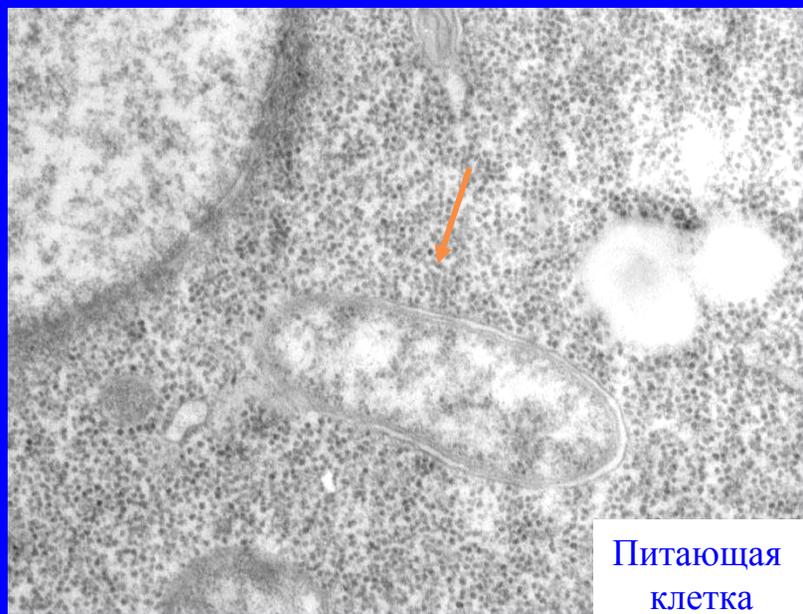


# Присутствие бактерий 1 и 2 типа в клетках яичников *Drosophila*

1 тип

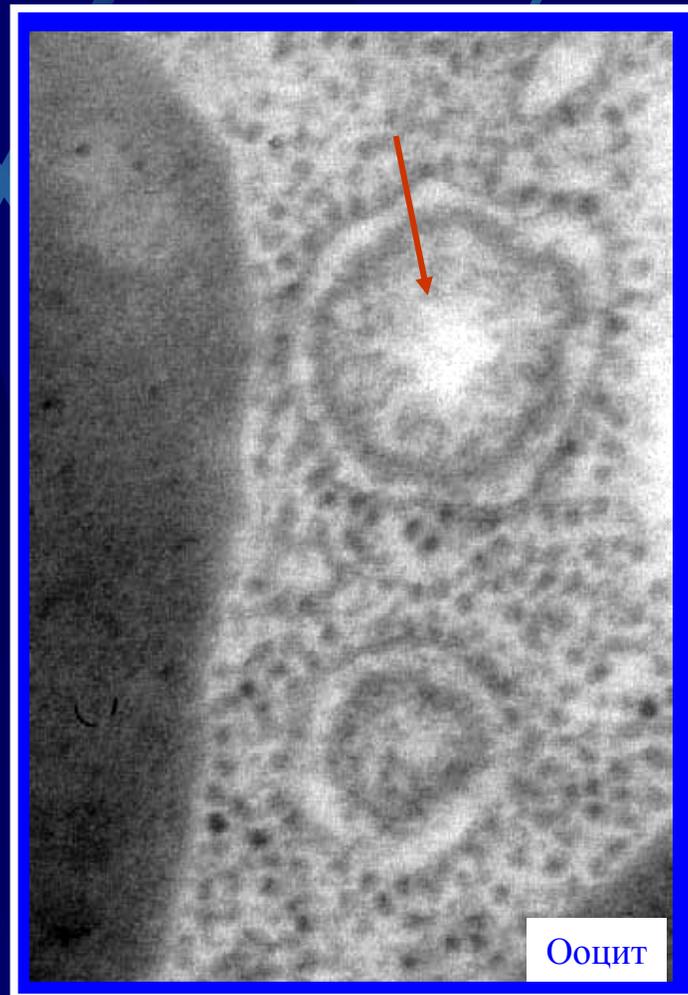


Ооцит



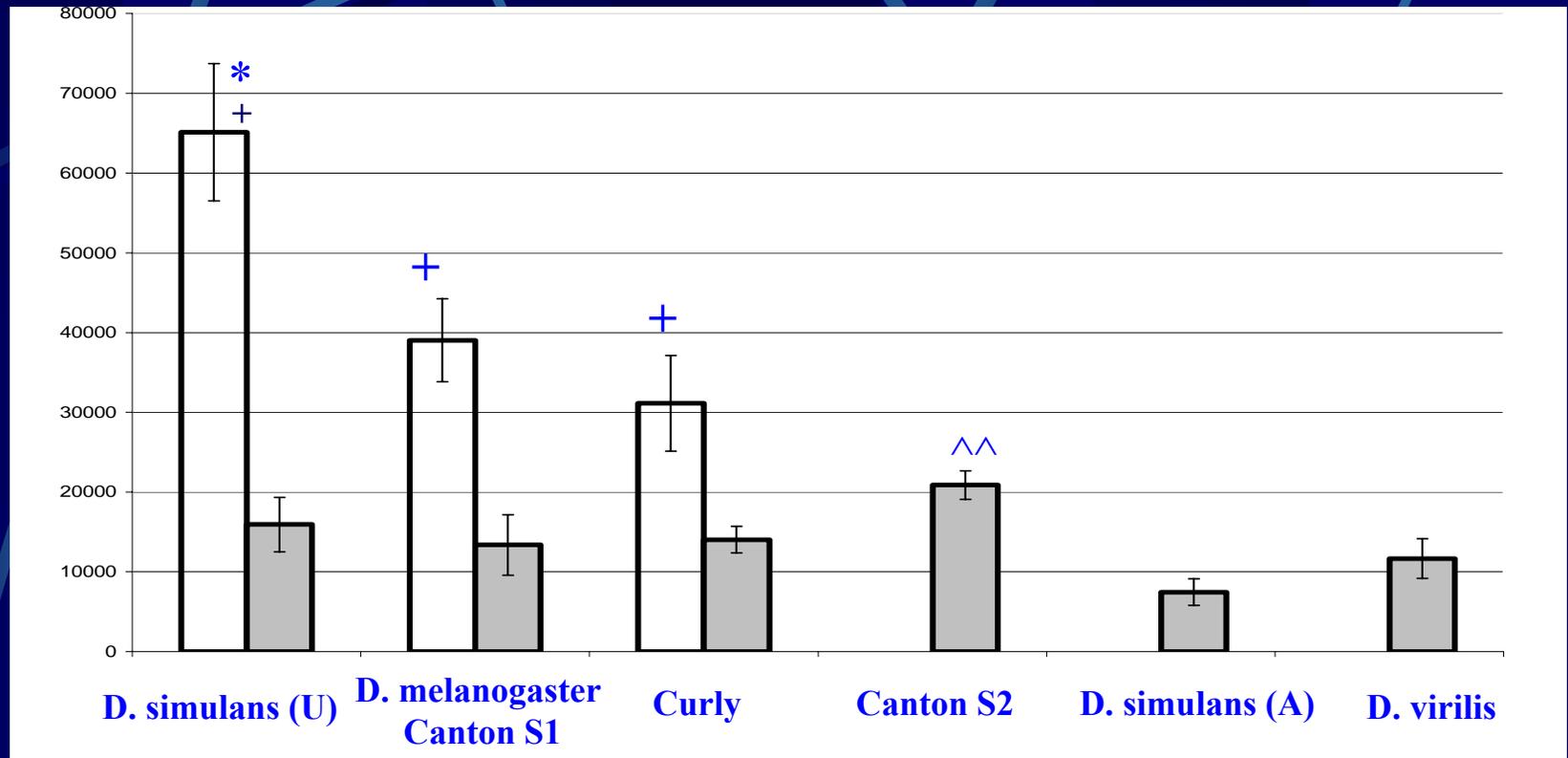
Питающая  
клетка

2 тип



Ооцит

# Количество бактерий первого (светлые столбцы) и второго (темные столбцы) типа в цитоплазме эмбрионов *Drosophila*



\* - Достоверность отличий равна 0,99 между количеством бактерий первого типа в эмбрионах *D. simulans* (U) и количеством бактерий во всех остальных линиях.

+ - Достоверность отличий равна 0,99 между количеством бактерий первого типа в эмбрионах и количеством бактерий второго типа

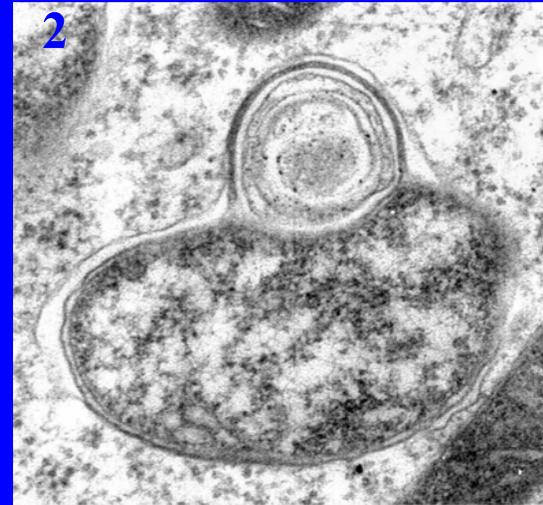
^^ - Достоверность отличий равна 0,95 между количеством бактерий второго типа в цитоплазме эмбрионов линии *D. melanogaster* (Canton S2) и количеством бактерий второго типа в эмбрионах

# Характеристика симбионтов, выявленных в ранних эмбрионах и клетках яичника разных линий *Drosophila*

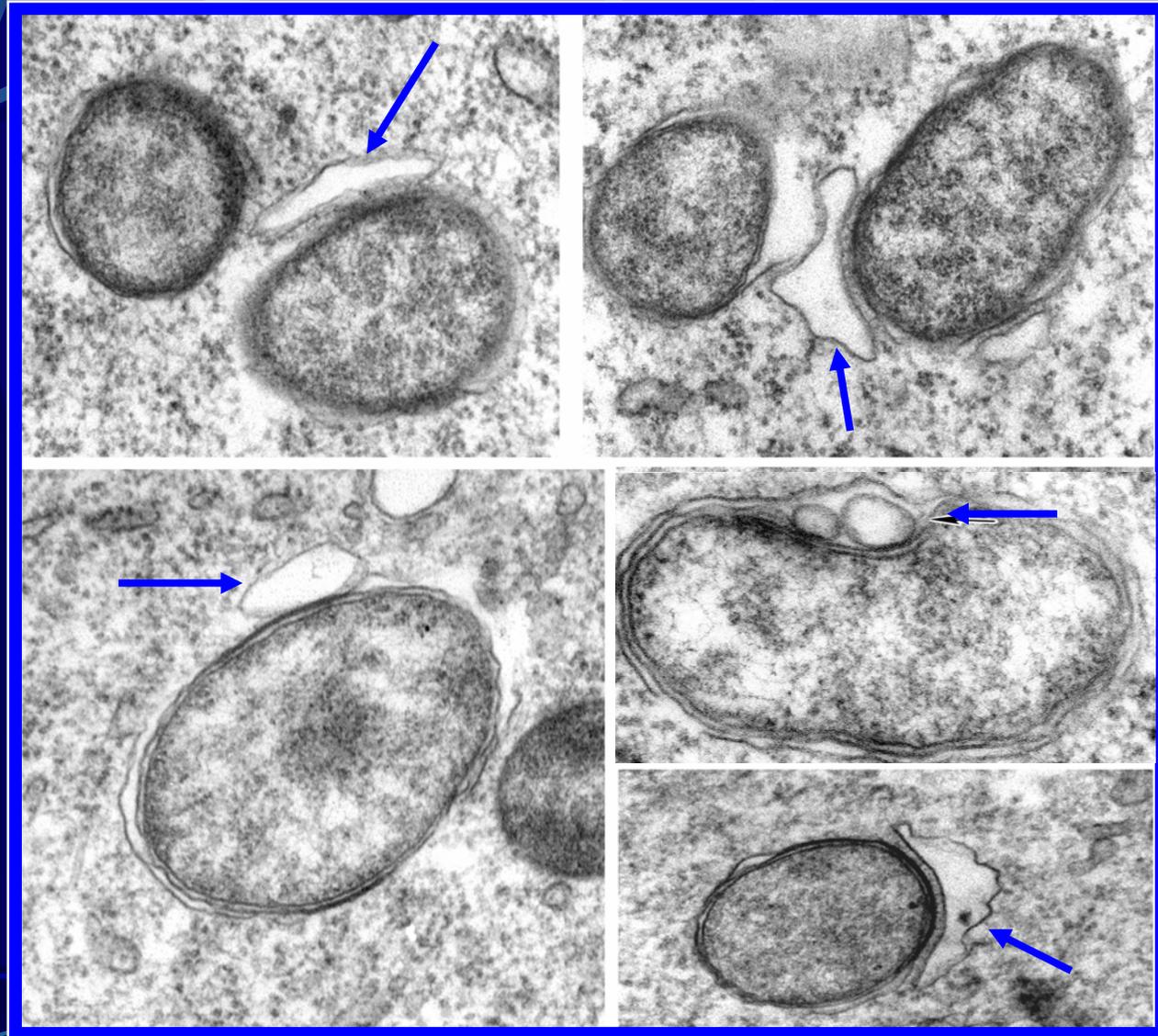
Линии мух	типы бактерий		Устойчивость к антибиотика		Влияние на выживаемость эмбрионов (%)
	1 тип	2 тип	1 тип	2 тип	
<i>D. simulans</i> (U)	wRi	+	вызывает гибель (литературные данные)	не определено	41
<i>D. melanogaster</i> (Canton S1)	wMel	+	вызывает гибель	не влияет	83
<i>D. melanogaster</i> (Curly)	wMel	+	вызывает гибель	не влияет	72
<i>D. melanogaster</i> (Canton S2)	-	+		не влияет	80
<i>D. simulans</i> (A)	-	+		не определено	75
<i>D. virilis</i>	-	+		не определено	75

Исследовать возможные структурно-функциональные взаимодействия между симбиотическими бактериями и внутриклеточными компартментами *Drosophila*

Формирование споро-подобных структур бактериями *Wolbachia* (*wRi*) в эмбрионах *D. simulans* (*U*)

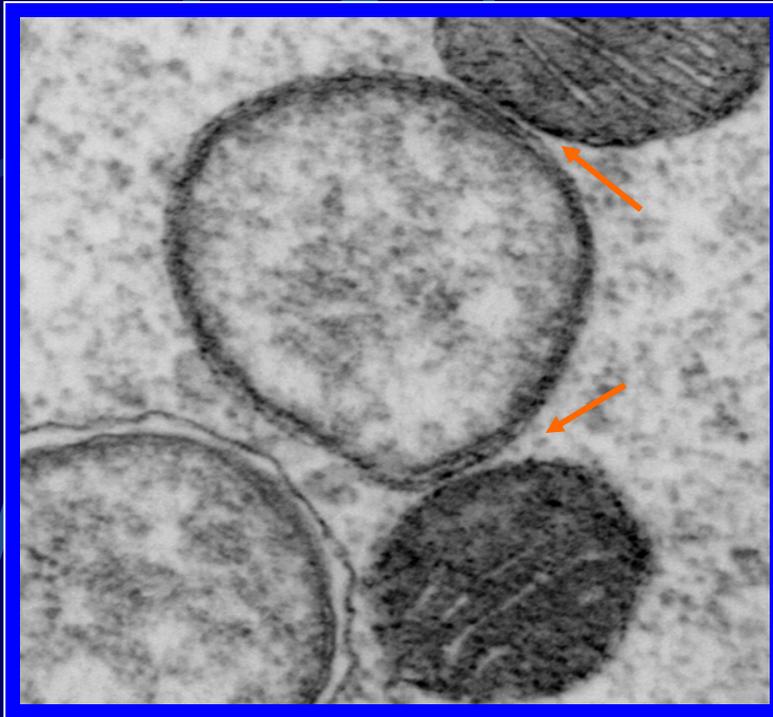


Первый тип симбионтов (*Wolbachia*) формируют вакуоли, отходящие в цитоплазму эмбриона *Drosophila*

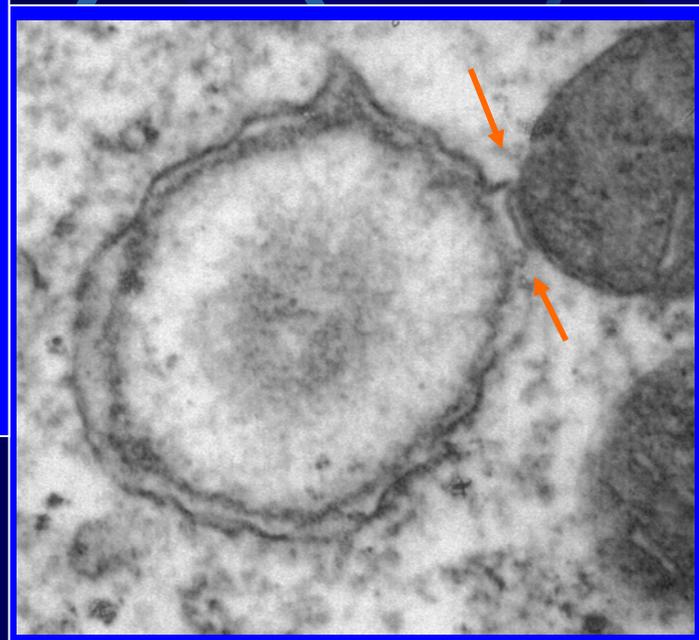


# Контакт бактерий с митохондриями в цитоплазме эмбрионов *Drosophila*

Тип 1

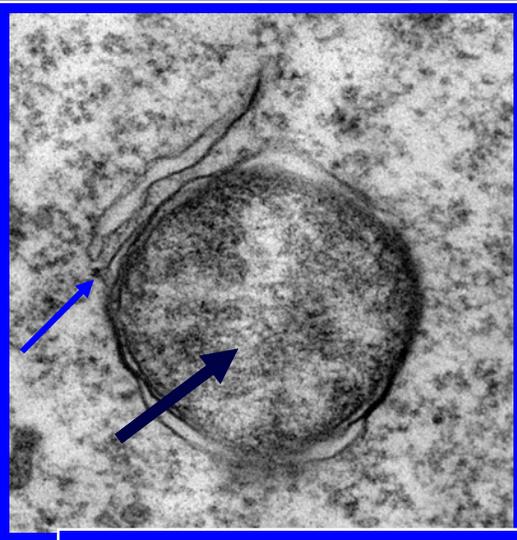


Тип 2

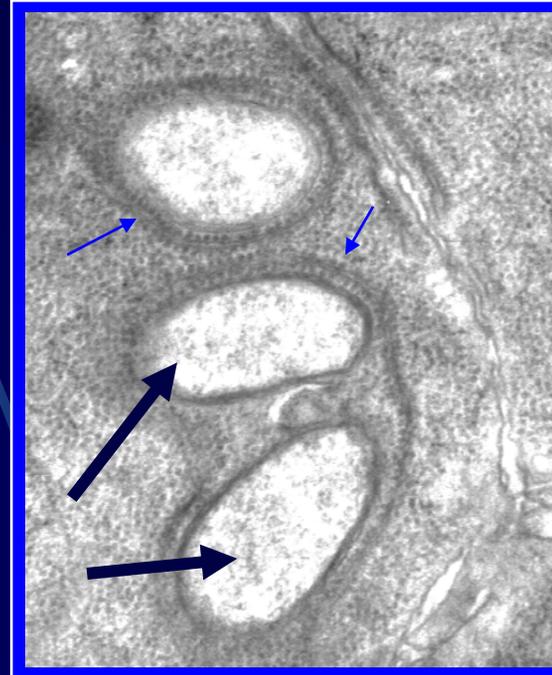


# Контакты бактерий первого (синие стрелки) и второго (красная стрелка) типов с эндоплазматическим ретикулумом

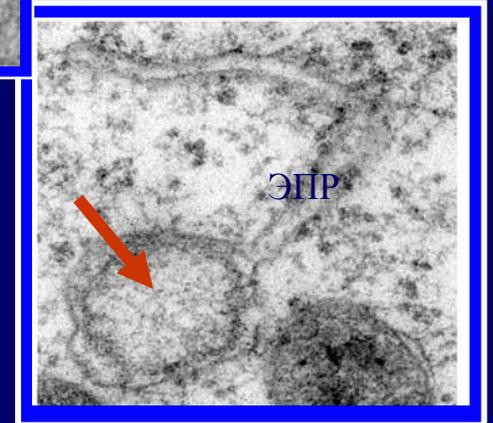
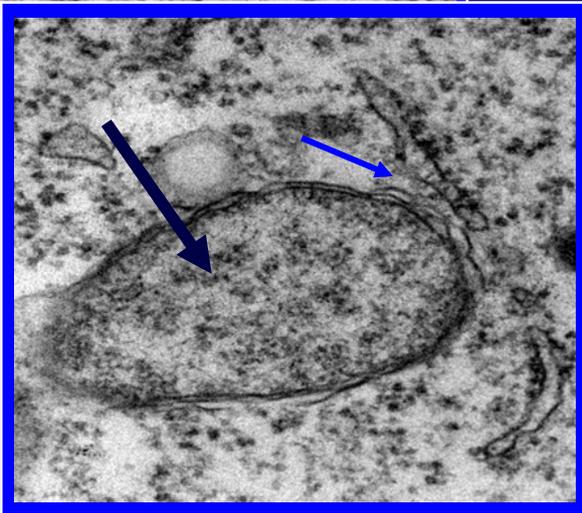
эмбрион



ооцит

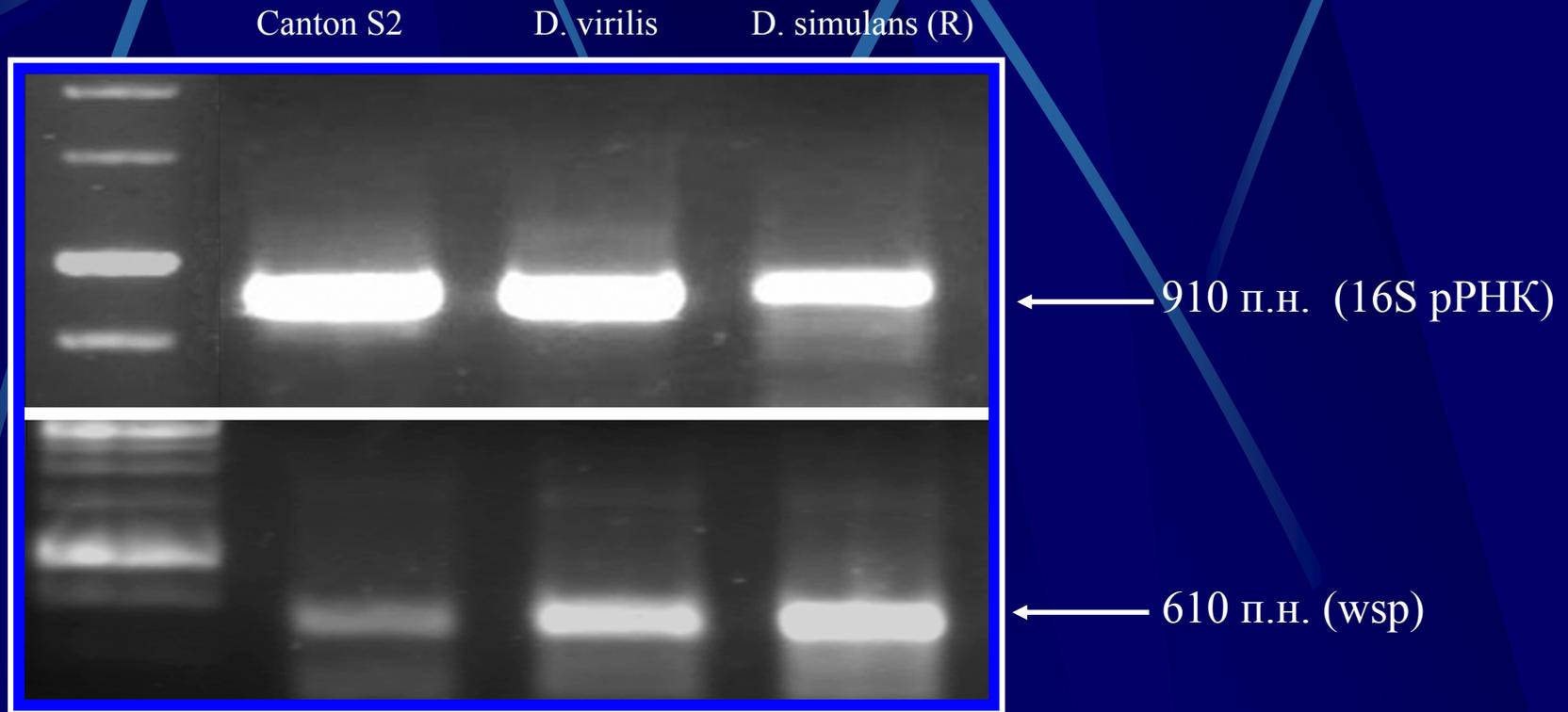


эмбрион



# Молекулярно-биологическое исследование видовой принадлежности симбиотических бактерий второго типа

ПЦР анализ тотальной ДНК эмбрионов мух (содержащих только бактерии 2 типа) с *Wolbachia*-специфичными праймерами для 16S rDNA и wsp-гена



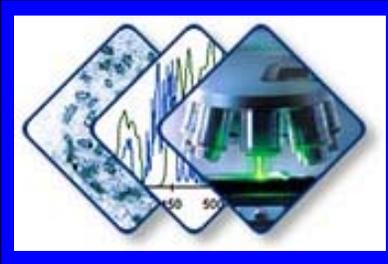
## Выводы:

1. В работе с помощью флуоресцентной и электронной микроскопии, а также молекулярно-биологических методов проведено исследование симбионтов в шести лабораторных линиях дрозофил и установлено, что они содержат два типа бактерий, различающихся по морфологии.
2. Показано, что первый тип симбионтов относится к роду *Wolbachia* (wRi и wMel). В процессе раннего эмбриогенеза бактерии локализуются преимущественно вблизи ядер, а также на периферии эмбриона. В интерфазе митоза бактерии распределяются случайно вокруг ядер, а на стадиях метафазы, анафазы и ранней телофазы образуют кластеры вблизи полюсов веретена деления. Предполагается, что это обусловлено взаимодействием наружной мембраны бактерий с астральными микротрубочками и другими компонентами цитоскелета в клетках хозяина.
3. Установлено, что в ранних эмбрионах и клетках яичника линий *D. simulans* (U), *D. melanogaster* (Canton S1 и Curly), присутствуют симбиотические бактерии *Wolbachia* (штаммы wRi и wMel), которые имеют типичную морфологию и окружены дополнительной наружной мембраной. Впервые показано, что *Wolbachia* (штамм wRi) обладают способностью формировать споро-подобные структуры в эмбрионах линии *D. simulans* (U). Продемонстрированы последовательные стадии формирования спор.

4. При сравнительном ультраструктурном исследовании шести линий дрозофил впервые обнаружен необычный тип симбионтов (второй тип бактерий), который присутствует вместе с *Wolabchia* или без них в цитоплазме эмбрионов и ооцитов дрозофил. Установлено, что второй тип симбионтов локализуется внутри цистерн ЭПР и характеризуется наличием аморфной оболочки и небольшим количеством рибосом в матриксе.
5. Показано, что бактерии, как первого, так и второго типов делятся и тесно взаимодействуют с различными цитоплазматическими компартментами эмбрионов и ооцитов дрозофилы, включая ЭПР, митохондрии и желточные гранулы. Кроме того, бактерии первого типа могут формировать секреторные вакуоли в цитоплазме эмбрионов *D. simulans* (U), *D. melanogaster* (Canton S1 и Curly). Это может свидетельствовать об активности симбиотических бактерий в клетках дрозофилы.

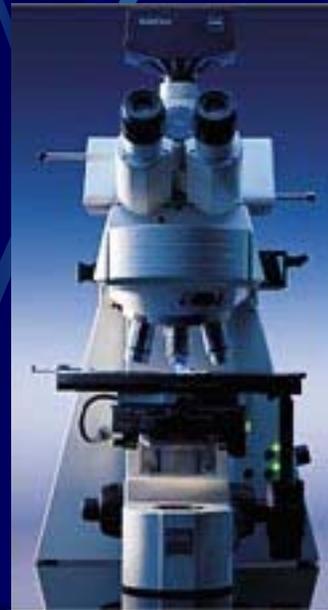
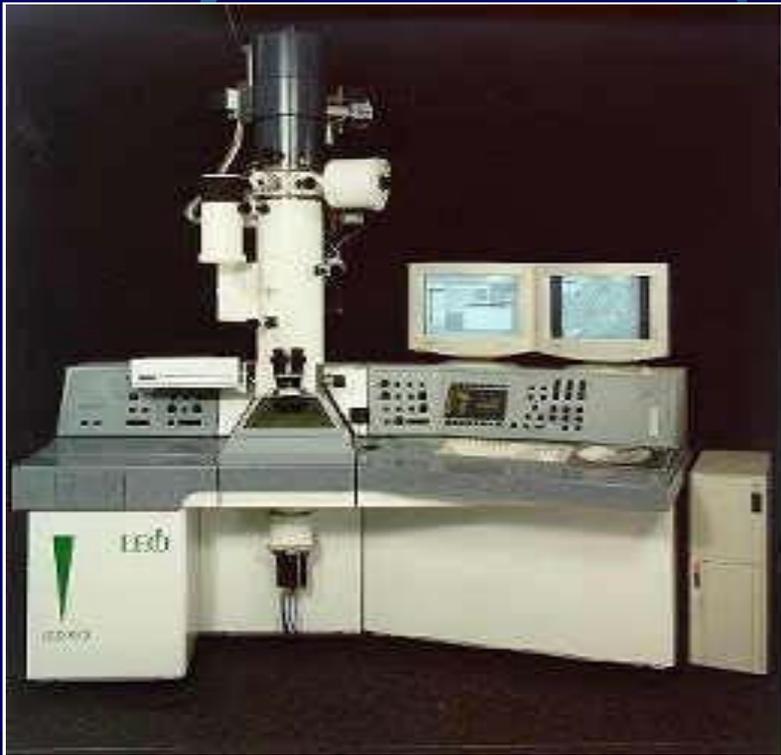
Автор выражает глубокую признательность руководителю работы Елене Владимировне Киселевой. Всем сотрудникам лаборатории Морфологии и функции клеточных структур.

Работа выполнена в лаб. Морфологии и Функции  
Клеточных Структур (ЦКП микроскопического  
анализа биологических объектов СО РАН)



Работа выполнена при поддержке программы  
президиума РАН №24.4  
«Динамика генофондов растений,  
животных и человека»

<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>



**Благодарности:**

Коллективу лаб.  
Эволюционной биологии  
клетки  
(руководитель Э.М. Баричева)  
лаб. Генетики популяций  
(руководитель И.К. Захаров)

Рецензентам А.Г. Блинову и

С.А. Демакову