

УДК 537.533.35:575.826:579.252.58:591.557

ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ *DROSOPHILA MELANOGASTER*, ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАТОГЕННЫМ ШТАММОМ БАКТЕРИЙ *WOLBACHIA*

© 2013 г. А.А. Струнов, Ю.Ю. Илинский, И.К. Захаров, Е.В. Киселева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: strunov.anton@gmail.com

Поступила в редакцию 6 апреля 2013 г. Принята к публикации 30 апреля 2013 г.

Патогенный штамм *Wolbachia* wMelPop обнаруживается в центральной нервной системе, мышцах и сетчатке *Drosophila melanogaster* и сокращает выживаемость своего хозяина в два раза. Это делает возможным его применение для борьбы с насекомыми – вредителями сельского хозяйства и переносчиками различных заболеваний человека. Любая симбиотическая ассоциация в природе находится под действием различных стрессов, таких, как голодание, пониженная или повышенная температура и другие, которые существенно влияют на особенности взаимоотношения партнеров. В настоящей работе исследовано действие пониженной (16 °С) и повышенной (29 °С) температур на выживаемость и продолжительность жизни самок *D. melanogaster*, инфицированных *Wolbachia* штамма wMelPop; а также проведен анализ ультраструктуры клеток мозга и распределения в них бактерий. Увеличение времени содержания вылетевших имаго при повышенной температуре снижает их продолжительность жизни, причем влияние температуры проявляется после трех дней экспозиции. На 7-й день содержания мух при повышенной температуре в клетках их мозга появляются электронноплотные структуры, напоминающие деградирующие бактерии, количество которых резко возрастает к 13-му дню инкубации при 29 °С. На основании данных популяционного и электронно-микроскопического анализа нами выделен критический период воздействия повышенной температуры с 7-го по 13-й день после начала экспозиции, после которого происходит резкое снижение выживаемости *D. melanogaster*.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, патогенный штамм *Wolbachia* wMelPop, электронная микроскопия, повышенная температура.

ВВЕДЕНИЕ

Эндосимбионты *Wolbachia* являются одними из самых распространенных грамотрицательных бактерий в природе, населяющих в основном репродуктивные органы артропод и некоторых нематод и передающихся из поколения в поколение по материнской линии (Serbus *et al.*, 2008). Помимо репродуктивных органов *Wolbachia* обнаруживаются также в различных типах тканей личинок и взрослых особей своих хозяев (Dobson *et al.*, 1999; McGraw *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2005; Жукова и др., 2008). Влияние *Wolbachia* варьирует от мутуалистического до

паразитического в зависимости от вида хозяина и штамма бактерий (Serbus *et al.*, 2008). Штамм *Wolbachia* wMelPop является ярким примером патогенного эндосимбионта, который активно размножается в клетках мозга, сетчатки и мышц *Drosophila melanogaster* и снижает продолжительность жизни (ПЖ) хозяина в два раза по сравнению с незараженной линией (Min, Benzer, 1997). Паразитический штамм *Wolbachia* может быть использован в качестве безвредного для окружающей среды агента в борьбе с вредителями сельского хозяйства и переносчиками различных заболеваний человека. Так, недавно был осуществлен успешный перенос штамма

wMelPop в организм москита *Aedes aegypti*, основного переносчика лихорадки Денге, и продемонстрировано сохранение инфекции в его последующих поколениях (McMeniman *et al.*, 2009). Инфицированные москиты с высоким титром бактерий в голове, груди и брюшке имели сокращенную на 50 % продолжительность жизни (ПЖ), и *Wolbachia* оказывали прямое влияние на обособление вируса в организме хозяина (Moreira *et al.*, 2009). Однако перед применением wMelPop в полевых испытаниях необходимо выяснять, как этот штамм будет взаимодействовать с хозяином в условиях постоянно меняющейся окружающей среды.

Известно, что любой организм в природе подвержен действию различных стрессовых факторов. Одним из них является температура, которая оказывает значительное влияние на физиологические и биохимические процессы, а также поведенческие реакции животных (Thomas, Blanford, 2003). В данной работе мы исследовали влияние временного воздействия повышенной температуры (29 °C) на ПЖ и выживаемость самок *D. melanogaster*, как инфицированных так и неинфицированных патогенным штаммом *Wolbachia* wMelPop. С помощью электронной микроскопии при различных температурных режимах мы провели сравнение морфологии клеток мозга самок *D. melanogaster*, а также проанализировали ультраструктуру и распределение бактерий в этих клетках. По результатам данного исследования мы определили специфический период воздействия повышенной температуры, при котором происходит существенное снижение выживаемости *D. melanogaster* и нарушается ультраструктура *Wolbachia*. Увеличение числа бактерий в клетках и изменение морфологии *Wolbachia* выдвигаются в качестве главного фактора, снижающего среднюю ПЖ и выживаемость мух.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Линия мух *D. melanogaster* w1118, зараженная патогенным штаммом *Wolbachia* wMelPop, была любезно предоставлена профессором Скотом О'Нейлом (Университет Квинсленда, Австралия). Неинфицированную линию по-

лучили путем содержания мух в течение двух поколений на корме с добавлением 0,03 % тетрациклина (вес/объем). Инфекционный статус линии проверяли с помощью ПЦР (данные не приведены). С учетом того что бактерии *Wolbachia* передаются из поколения в поколение по материнской линии (Serbus *et al.*, 2008), в данной работе мы проводили эксперименты на самках *D. melanogaster* w1118.

Тест на продолжительность жизни

Эксперимент по выживаемости инфицированных и неинфицированных самок проводился при нескольких температурных режимах. В каждом отдельном эксперименте было взято от 90 до 210 мух по 30 особей на пробирку со стандартным изюмным кормом. Самки *D. melanogaster* развивались при комнатной температуре (23–25 °C) и при вылете из куколок переносились на определенный температурный режим (рис. 1). В качестве контроля ПЖ использовали самок, содержащихся постоянно при пониженной температуре 16 °C, и вели учет каждые 3 дня до полной гибели мух. В опыте вылетевшие имаго определенное количество дней (3, 7 и 13) содержались при повышенной температуре (29 °C), а затем при температуре 16 °C до полной гибели (рис. 1). Учет ПЖ проводился по дням, соответствующим контролю. Мух переносили на свежий корм каждые 5 дней при содержании при температуре 16 °C и каждый день – при температуре 29 °C.

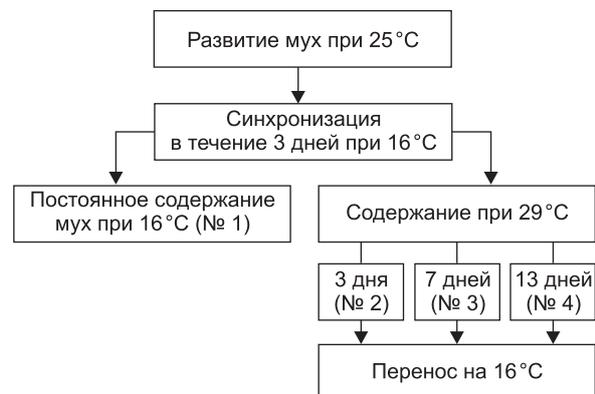


Рис. 1. Схема эксперимента по исследованию продолжительности жизни самок *D. melanogaster*, инфицированных и неинфицированных патогенным штаммом *Wolbachia* wMelPop.

Кривые выживаемости мух были построены по методу Каплана–Майера и проанализированы с помощью лог-ранк теста.

Просвечивающая электронная микроскопия

Фиксация образцов мозга самок *D. melanogaster* *w¹¹¹⁸* для электронной микроскопии проводилась по методу Terasaki с соавт. (2001). Образцы выделяли в 0,1 М фосфатном буфере (pH = 7,4) и фиксировали в 2,5 %-м (вес/объем) глутаровом альдегиде (Fluka, Швейцария) на том же буфере в течение 2,5 ч. После фиксации образцы 3 раза по 5 мин отмывали фосфатным буфером и постфиксировали 1 ч в 1 %-м (вес/объем) OsO₄ (ОАО Аурат, Россия) и 0,8 %-м (вес/объем) калии железосинеродистом на том же буфере. Затем материал инкубировали 12 ч при 4 °С в 1 %-м водном растворе уранил ацетата (Serva, Германия). После этого образцы мозга дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации (30, 50, 70, 96 % по 10 мин и 100 % в течение 20 мин) и ацетоне (дважды по 20 мин) и заключали в смолу Agar 100 Resin (Agar, Великобритания). Полутонкие срезы образцов получали с помощью ультратома Reichert-Jung (Австрия), окрашивали метиленовым синим и анализировали под световым микроскопом Axioscop 40 (Zeiss, Германия). Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме Leica ultracut (Leica, Австрия), окрашивали цитратом свинца по Рейнольдсу (Reynolds, 1963) и анализировали в электронном микроскопе JEOL JEM-100SX (JEOL, Япония).

Фиксация образцов мозга проводилась на 30-й день постоянного содержания мух при 16 °С, а также на 30-й день содержания мух при 16 °С после обработки повышенной температурой в течение 3, 7 и 13 дней.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Средняя продолжительность жизни и выживаемость инфицированных и неинфицированных самок при различных температурных режимах

Тест на ПЖ зараженных и незараженных *w^{MelPop}* самок *D. melanogaster* *w¹¹¹⁸* прово-

дился при 4 различных температурных режимах, условно обозначенных как № 1, 2, 3 и 4. При режиме № 1 мух постоянно содержали при 16 °С и полученные данные по их ПЖ и выживаемости использовали в качестве контроля. При режимах № 2, 3 и 4 мух содержали при повышенной температуре 29 °С в течение 3, 7 и 13 дней соответственно и впоследствии переносили в пониженную температуру (16 °С), где они содержались до полной гибели. По результатам экспериментов были построены графики средней ПЖ и кривые выживаемости (рис. 2, а–в). Средняя ПЖ зараженных и незараженных самок в условиях постоянного содержания при 16 °С составила $103,8 \pm 5,6$ и $132,3 \pm 2,6$ дней соответственно (рис. 2, а). В условиях температурного режима № 2 средняя ПЖ инфицированных мух достоверно не отличалась от контроля и составляла $96,7 \pm 5,3$ дней, а неинфицированные мухи жили на ~10 % меньше ($114,9 \pm 4,2$ дней). При режиме № 3 средняя ПЖ зараженных самок сократилась на ~30 % ($72,1 \pm 4,5$ дней), а у незараженных – лишь на 7 % ($123,8 \pm 4,9$ дней) по сравнению с контролем. 13 дней содержания при повышенной температуре (режим № 4) оказали существенное влияние на среднюю ПЖ, сократив ее у инфицированных самок на 75 % ($28,1 \pm 4,0$ дней) и на 40 % у неинфицированных ($77,0 \pm 7,7$) по сравнению с контролем.

Данные, полученные по выживаемости самок при различных температурных режимах, были разбиты на две группы. Первую группу использовали для сравнения выживаемости зараженных (рис. 2, б) и незараженных (рис. 2, в) самок в равных условиях их содержания, чтобы оценить влияние инфекции на организм хозяина. Вторая группа использовалась для сравнения выживаемости только неинфицированных самок, чтобы выявить действие различных температурных режимов на мух (рис. 2, в). По данным из первой группы выживаемость инфицированных самок была достоверно ниже выживаемости неинфицированных при всех температурных режимах (режим № 1: $\chi^2 = 117$, d.f. = 1, $P < 0,0001$; режим № 2: $\chi^2 = 75$, d.f. = 1, $P < 0,0001$; режим № 3: $\chi^2 = 194$, d.f. = 1, $P < 0,0001$; режим № 4: $\chi^2 = 147$, d.f. = 1, $P < 0,0001$). По данным из второй группы по сравнению

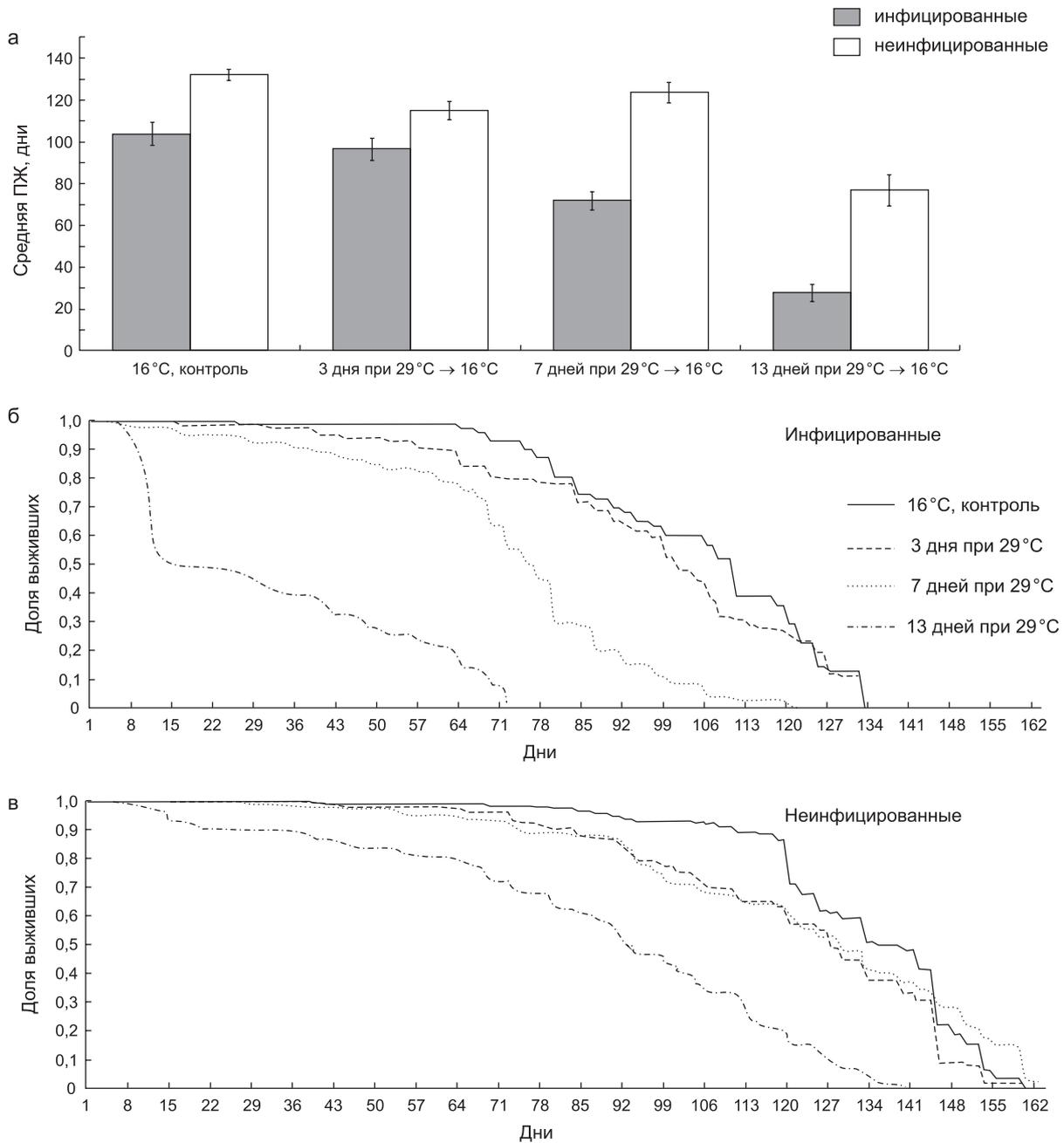


Рис. 2. Средняя продолжительность жизни (а) и кривые выживаемости (б, в) зараженных и незараженных самок *D. melanogaster willis*, содержавшихся при 16 °С постоянно (режим № 1), а также после обработки повышенной температурой 29 °С в течение 3, 7 и 13 дней (режимы № 2, 3, 4 соответственно).

с контролем обработка повышенной температурой оказывала действие только в случае содержания мух при режимах № 3 и № 4 (режим № 3 : $\chi^2 = 11$, d.f. = 1, $P < 0,004$; режим № 4: $\chi^2 = 220$, d.f. = 1, $P < 0,0001$), а при режиме № 2 воздействие 29 °С было статистически незначимым ($\chi^2 = 0,35$, d.f. = 1, $P < 0,84$).

Ультраструктура клеток мозга и распределение бактерий при различных температурных режимах

Для того чтобы оценить влияние различных температурных режимов на строение клеток мозга, ультраструктуру бактерий и их распределение в этих клетках, а также проанализировать

причину резкого снижения продолжительности жизни и выживаемости самок при температурных режимах № 3 и № 4, были проведены электронно-микроскопические исследования. Согласно данным популяционного анализа, на 30-й день содержания инфицированных мух при 16 °С без воздействия повышенной температуры гибнет лишь 1 % особей. В этой же точке после 3 дней воздействия температурой 29 °С гибнет незначительно больше мух – 2 %. После 7 дней воздействия повышенной температурой на 30-й день при 16 °С погибает около 10 % насекомых, а после 13 дней – более половины (60 %). Подобная динамика выживаемости мух обусловила выбор точки фиксации (30-й день) образцов мозга для электронной микроскопии. Электронно-микроскопический анализ показал, что клетки нейронов и глиии располагаются в основном по периферии мозга мух (данные не показаны). Внутреннее пространство мозга заполнено преимущественно аксонами и дендритами нейронов, тесно контактирующих и фор-

мирующих сложные переплетения – нейропилы (Loesel *et al.*, 2002).

Режим № 1. Постоянное содержание самок при 16 °С (контроль). Ультраструктурный анализ клеток мозга контрольной группы мух (16 °С) показал, что тела нейронов имеют, как правило, вытянутую форму и цитоплазму, обогащенную органеллами и специфически секреторными гранулами (рис. 3, а). Ядра клеток имеют чаще всего округлую форму с электронно-светлым матриксом и содержат 1–2 ядрышка. Клетки глиии хорошо выявляются по множественным отросткам цитоплазмы, контактирующим с близлежащими телами нейронов, и по электронно-плотному округлому или вытянутому ядру, занимающему большой объем клетки и содержащему многочисленные глыбки гетерохроматина и 1–2 ядрышка (рис. 3, б).

Wolbachia штамма wMelPop имеют округлую, реже вытянутую форму (рис. 3, в, г). Их оболочка состоит из трех мембран, две из которых, внутренние, имеют бактериальное, а

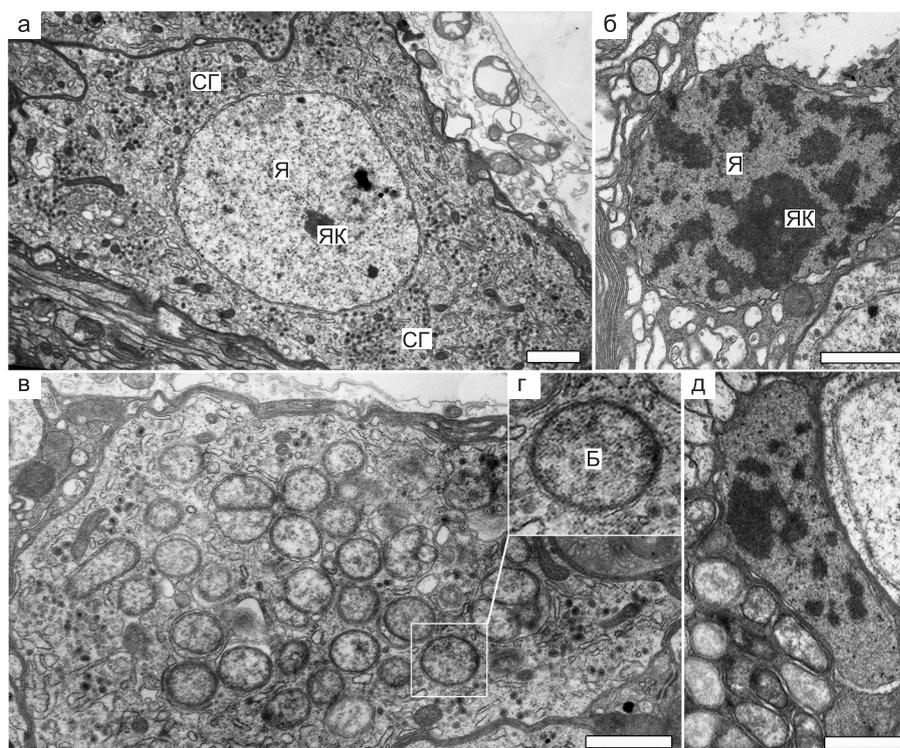


Рис. 3. Ультраструктурная организация клеток центрального отдела мозга мух и распределение бактерий в этих клетках при постоянном содержании при 16 °С.

а, б – незараженные бактериями нейрон и клетка глиии соответственно; в, г, д – распределение бактерий в теле нейрона (в, г) и в клетке глиии (д); Я – ядро, ЯК – ядрышко, СГ – секреторные гранулы, Б – бактерии. Масштаб – 1 мкм.

внешняя – хозяйское происхождение. Бактерии были обнаружены в обоих типах клеток мозга. В нейронах они располагаются небольшими скоплениями от 5 до 30 бактерий на срез клетки, часто недалеко от ядра в месте отхождения аксона от сомы (рис. 3, в). Иногда встречаются скопления бактерий, лежащие под общей наружной мембраной. По сравнению с нейронами клетки глии содержат меньше *Wolbachia* (1–15 бактерий на срез клетки), тесно контактирующих с ядром и образующих небольшие плотные скопления (рис. 3, д).

Режим № 2. Содержание самок в течение 3 дней при температуре 29 °С и последующее их содержание при температуре 16 °С. Ультраструктура клеток мозга *D. melanogaster* после 3 дней содержания при повышенной температуре не изменяется по сравнению с контролем (рис. 4, а, б). Титр бактерий в клетках мозга, пре-

имущественно в нейронах, немного увеличивается. Бактерии образуют плотные скопления, занимающие иногда пространство нескольких клеток (рис. 4, в). В клетках глии плотность *Wolbachia* остается неизменной по сравнению с контролем (рис. 4, г).

Режим № 3. Содержание самок в течение 7 дней при температуре 29 °С и последующее их содержание при 16 °С. После 7 дней содержания мух при 29 °С ультраструктура нейронов и клеток глии не отличается от контроля (рис. 5, а, б). Увеличение количества *Wolbachia* происходит как в телах нейронов, так и в глии (рис. 5, в, г). Бактерии в соме нейронов формируют плотные скопления, занимающие пространство нескольких близлежащих клеток. На границе скоплений иногда выявляются расширенные межклеточные полости, образующиеся, возможно, в результате разрушения клеток мозга

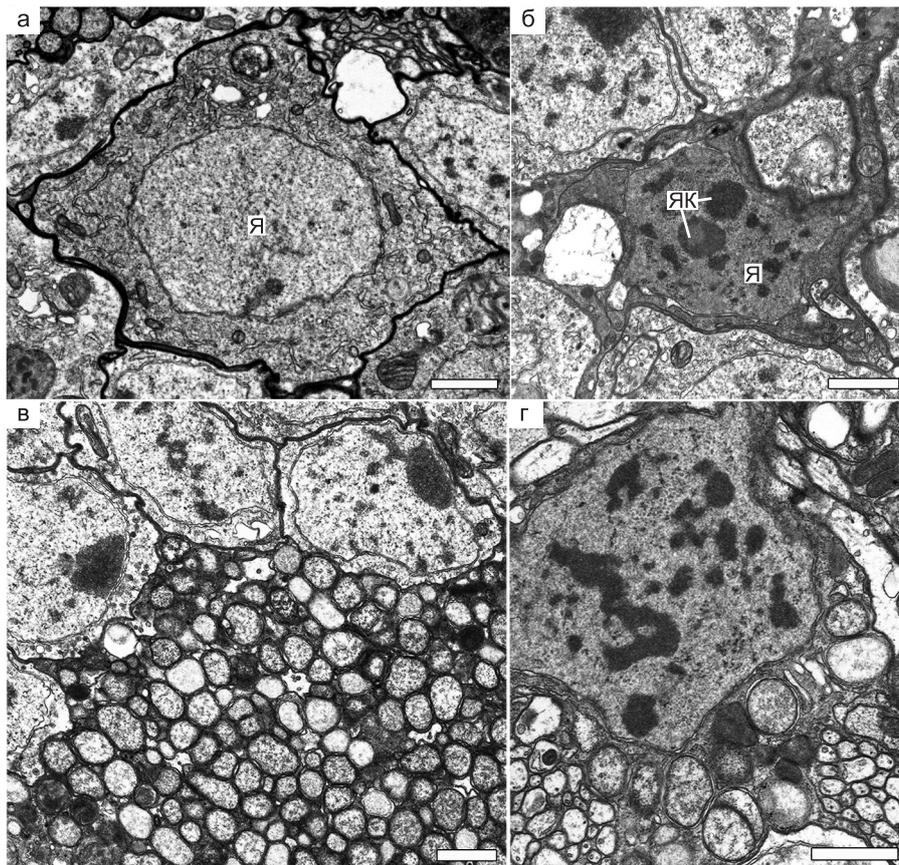


Рис. 4. Ультраструктурная организация клеток центрального отдела мозга мух и распределение в них бактерий после содержания мух при 29 °С в течение 3 дней и последующего их переноса в 16 °С.

а, б – незараженные бактериями нейрон и клетка глии соответственно; в, г – распределение бактерий в теле нейрона (в) и клетке глии (г); Я – ядро, ЯК – ядрышко. Масштаб – 1 мкм.

вследствие активной пролиферации бактерий (рис. 5, в). В клетках глии накопление *Wolbachia* происходит менее интенсивно по сравнению с нейронами. Количество бактерий в этих клетках варьирует от 1 до 20 и больших скоплений не обнаруживается (рис. 5, г). В телах нейронов помимо типичных бактерий *Wolbachia* со светлым матриксом нами были обнаружены элект-

ронно-плотные структуры с тройной оболочкой, напоминающие деградирующие бактерии (рис. 5, д). Подобные структуры были описаны ранее в яичниках (Жукова и др., 2008).

Режим № 4. Содержание самок в течение 13 дней при температуре 29 °С и последующее их содержание при температуре 16 °С. При содержании мух в течение 13 дней при повы-

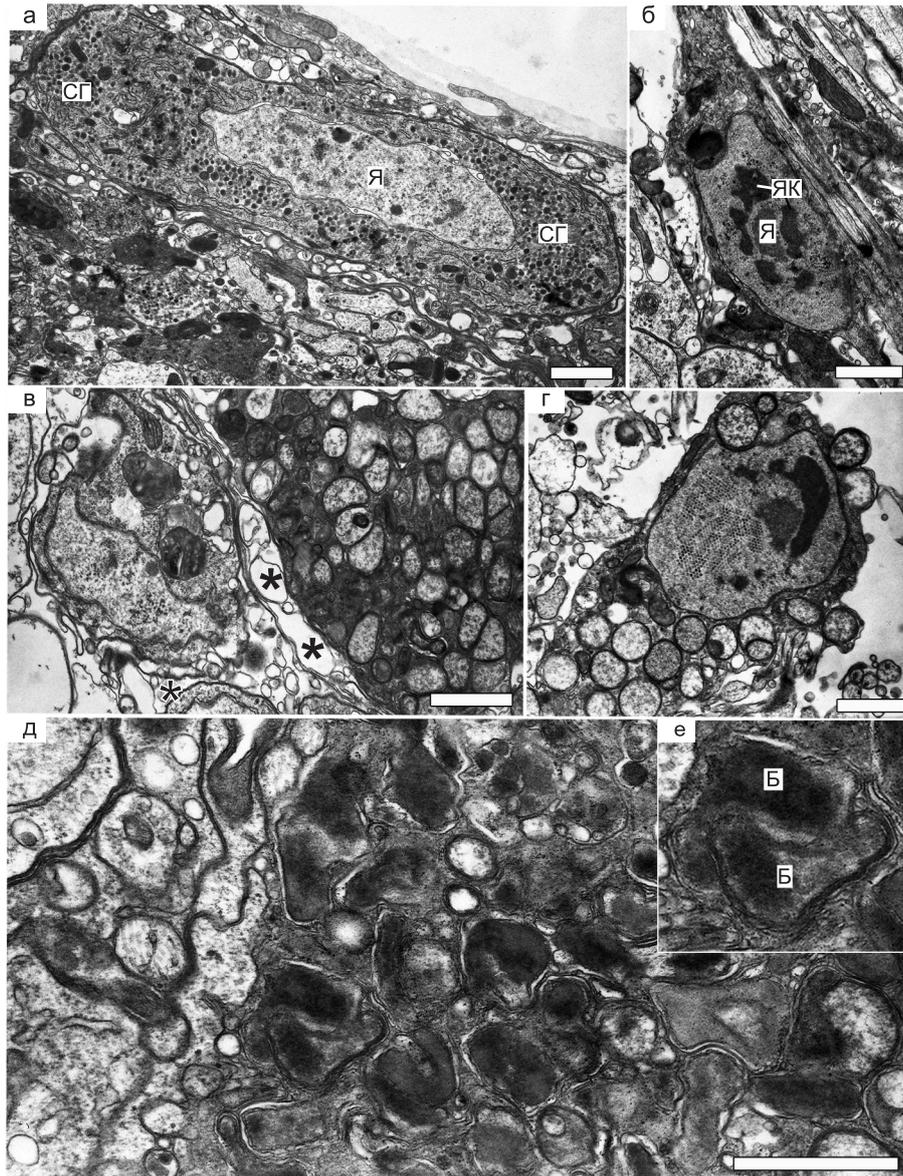


Рис. 5. Ультраструктурная организация клеток центрального отдела мозга мух и распределение бактерий в этих клетках при предварительной обработке 29 °С в течение 7 дней и последующем переносе в 16 °С.

а, б – незараженные бактериями тело нейрона и клетка глии соответственно; в, г – распределение бактерий в теле нейрона (в) и клетке глии (г); звездочками обозначены межклеточные полости; д – скопление бактерий в виде электронно-плотных структур; е – увеличенное изображение двух электронно-плотных структур. Я – ядро, ЯК – ядрышко, СГ – секреторные гранулы, Б – бактерии. Масштаб – 1 мкм.

шенной температуре и последующем их содержании при температуре 16 °С ультраструктура клеток мозга почти не изменяется (рис. 6, а, б), хотя в ядрах нейронов появляются многочислен-

ные глыбки компактного хроматина (рис. 6, а). Бактерии образуют большие скопления, занимающие пространство нескольких клеток, в основном нейронов (рис. 6, в). Помимо типичных

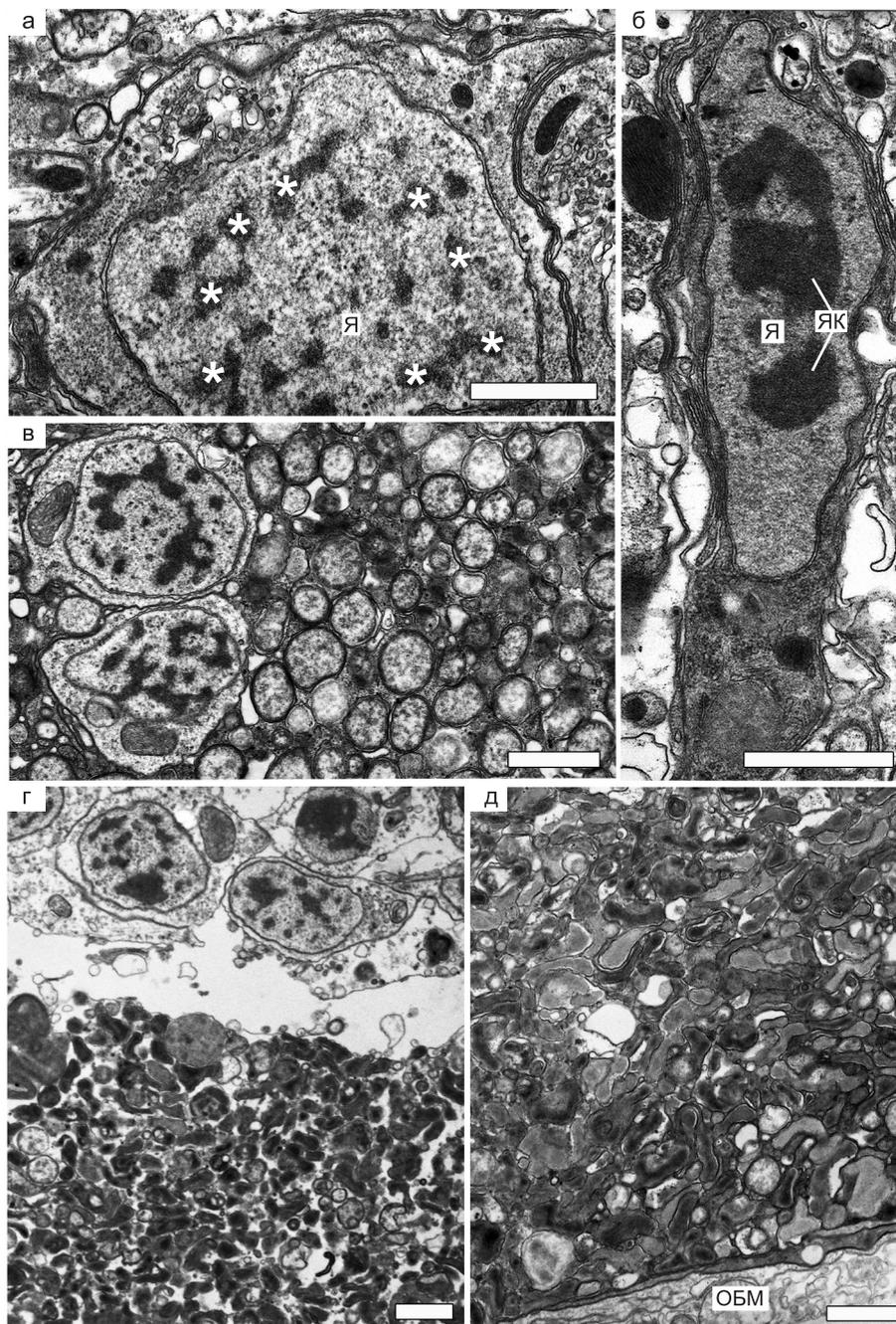


Рис. 6. Ультраструктурная организация клеток центрального отдела мозга мух и распределение бактерий в этих клетках при предварительном содержании мух при температуре 29 °С в течение 13 дней с последующим их содержанием при температуре 16 °С.

а, б – незараженные бактериями тело нейрона и клетка глии соответственно; белыми звездочками обозначены глыбки компактного хроматина; в – распределение бактерий в теле нейрона; г, д – большие скопления бактерий в виде электронно-плотных структур выходят под оболочку мозга; Я – ядро, ЯК – ядрышко, ОБМ – оболочка мозга. Масштаб – 1 мкм.

скоплений бактерий, часто встречаются крупные скопления электронно-плотных структур, которые обнаруживаются также под оболочкой мозга *D. melanogaster* (рис. 6, г, д). Кроме того, в этой области выявляются фрагменты разрушенных клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

Жизнеспособность эктотермных животных значительно зависит от температурных условий (Precht *et al.*, 1973; Cossins, Bowler, 1987). В окружающей среде организмы испытывают ежедневные флуктуации температур, часто с амплитудой более, чем 10 °С. В природе животное, попав в стрессовые условия, обычно стремится покинуть их как можно быстрее, поэтому воздействие определенной температуры происходит лишь кратковременно. Оптимальная температура развития *D. melanogaster* составляет 22 °С. При ее повышении сроки развития мух сокращаются и достигают минимума (8–9 дней) при 29 °С. Было показано, что жизнеспособность *D. melanogaster* стабильна при температуре от 14 до 26 °С и падает до нуля при снижении температуры до 10 °С или увеличении до 33 °С (Petavy *et al.*, 2001). Постоянное содержание *D. melanogaster w1118*, инфицированных *Wolbachia* штамма wMelPop, при 29 °С вызывает снижение их ПЖ примерно в 2 раза по сравнению с ПЖ при температуре 25 °С (Min, Benzer, 1997). В то же время при пониженной температуре 16 °С мухи этой линии живут примерно в 3 раза дольше по сравнению с их ПЖ при температуре 25 °С (Вайсман и др., 2009). Таким образом, температура 29 °С является стрессовой, но не критической для *D. melanogaster* и снижает их ПЖ, а температура 16 °С входит в диапазон стабильной температуры для жизнеспособности мух и замедляет их метаболизм, приводя к увеличению ПЖ в сравнении с оптимальной температурой 20–25 °С. Результаты нашего исследования показали, что перенос *D. melanogaster* в условия пониженной температуры 16 °С может частично или полностью восстанавливать ПЖ неинфицированных бактериями *D. melanogaster w1118*, которые до этого содержались при температуре 29 °С. Полное восстановление ПЖ происходит при содержании мух при повышенной температуре в первые три дня после вылета имаго включитель-

но. При воздействии температурой 29 °С дольше указанного периода происходит постепенное снижение выживаемости при температуре 16 °С. С помощью электронной микроскопии нами было установлено, что при любом температурном режиме содержания неинфицированных мух нервные клетки имеют типичную морфологию, что не противоречит вышеперечисленным данным о стабильной жизнеспособности мух при температуре 16 °С и некритическом действии температуры 29 °С.

В случае симбиотической ассоциации необходимо учитывать воздействия температуры отдельно на каждого из симбионтов, а также на их взаимоотношения в целом. Известно, что даже незначительные температурные изменения могут воздействовать на устойчивость хозяина к инфекционному агенту, а также влиять на вирулентность и размножение паразита (Thomas, Blanford, 2003). Например, в холодных условиях окружающей среды грибковый патоген *Entomophaga grylli* действует как смертельный фактор на популяцию кузнечиков *Zonocerus variegatus*. Однако в солнечные дни при увеличении температуры даже на 2 °С инфицированный хозяин восстанавливается от болезни и создает устойчивую группу особей (Chapman, Page, 1979). Показано, что повышенная температура (30–33 °С) элиминирует *Wolbachia* из организма двухточечного паутиного клеща *Tetranychus urticae* (van Opijnen, Breeuwer, 1999) и значительно сокращает титр бактерий у москитов *Aedes albopictus* (Wiwatanaratnabutr, Kittayapong, 2009). А у *D. melanogaster*, инфицированных *Wolbachia* штамма wMelPop, она приводит к активной пролиферации бактерий и преждевременной гибели хозяина (Min, Benzer, 1997). Пониженные температуры (12 °С) способствуют элиминации бактерий *Wolbachia* у паразитических ос *Trichogramma* (Pintureau *et al.*, 2003). Также было показано, что у наездников *Nasonia vitripennis* при 18 °С снижается титр *Wolbachia* на 65 % по сравнению с количеством бактерии, выявляемым при 25 °С (Bordenstein S.R., Bordenstein S.R., 2011).

Согласно нашим данным, постоянное содержание инфицированных штаммом wMelPop *D. melanogaster* при 16 °С не приводит к элиминации бактерий из организма хозяина. Несмотря на значительное увеличение средней

ПЖ инфицированных мух при пониженной температуре по сравнению со средней ПЖ при 25 °С, негативное влияние *Wolbachia* на выживаемость сохраняется. Этот результат противоречит данным, полученным ранее (Вайсман, 2009), которые демонстрируют, что мухи аналогичной инфицированной линии жили дольше неинфицированной. Наши данные показали, что средняя ПЖ инфицированных wMelPop мух при 16 °С постепенно падает с увеличением времени содержания при 29 °С. *Wolbachia* относятся к мезофильным бактериям, для которых оптимальной температурой для размножения считается 37 °С, хотя деление/размножение бактерий может идти в широком температурном диапазоне: от 22 до 42 °С (Кашнер, 1981). Температура 29 °С не является оптимальной температурой роста для мезофильных бактерий, но ее длительное воздействие, вероятно, приводит к постепенному увеличению скоплений бактерий. С помощью электронно-микроскопического анализа клеток мозга мух нами были обнаружены большие скопления бактерий, начиная с 7-го дня воздействия повышенной температурой. К 13-му дню экспозиции инфицированных мух количество крупных скоплений возрастает и появляются агрегаты электронно-плотных структур, предположительно, гибнущих бактерий. Аналогичные структуры в клетках мозга *D. melanogaster* w1118, содержащихся длительное время при 29 °С, были обнаружены ранее другой группой (Min, Benzer, 1997). Появление электронно-плотных образований в цитоплазме клеток было описано у нематод *Dirofilaria immitis*, инфицированных *Wolbachia*, и, по мнению W.J. Kozek (2005), эти структуры представляют собой одну из стадий размножения эндосимбионтов. Однако в другой работе было показано, что такие изменения морфологии бактерий являются показателями постепенной деградации эндосимбионтов (Hayes, Burgdorfer, 1982). Совокупность вышеперечисленных данных и наших исследований позволяет считать, что электронно-плотные структуры являются гибнущими бактериями *Wolbachia*. Причин гибели симбионтов может быть несколько. Одна из них – множественные разрушения клеток мозга и выход активно размножающихся при длительном воздействии повышенной температурой бактерий в межклеточное пространство. *Wolbachia*

являются внутриклеточными симбионтами и могут существовать вне клетки хозяина лишь несколько дней (Rasgon *et al.*, 2006). В мозге мух, содержащихся при температуре 16 °С, после 13 дней воздействия температурой 29 °С нами были зарегистрированы большие скопления гибнущих бактерий, вышедших из разрушенных клеток под оболочку мозга. Поскольку в ткани мозга встречаются также большие скопления *Wolbachia* типичной морфологии, можно предположить, что они представляют собой новообразованные конгломераты, а электронно-плотные скопления сформировались ранее и уже начинают разрушаться. Второй причиной может быть слишком большое скопление бактерий, что приводит к недостатку питательных веществ, необходимых для микроорганизмов, и постепенной их деградации.

Таким образом, в данной работе впервые проведена сравнительная оценка различных периодов воздействия повышенной температурой на выживаемость *D. melanogaster* w1118, инфицированных и неинфицированных патогенным штаммом *Wolbachia*. Пониженная температура не элиминирует *Wolbachia* штамма wMelPop из организма хозяина и увеличивает среднюю ПЖ *D. melanogaster* по сравнению с 25 °С. Данные популяционного и электронно-микроскопического анализа позволяют выделить критический период (7–13 дней) воздействия повышенной температурой, после которого происходит снижение выживаемости мух при температуре 16 °С, сопровождающееся образованием в ткани мозга больших скоплений деградирующих бактерий. Замедленный вывод продуктов деградации бактерий из ограниченного пространства в ткани мозга, вероятно, вызывает гибель клеток, что приводит к общему снижению жизнеспособности насекомого. Существенное снижение выживаемости мух и образование конгломератов электронно-плотных структур свидетельствуют о том, что разрушающиеся бактерии являются главным фактором, снижающим продолжительность жизни мух.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность М.В. Жуковой за плодотворное обсуждение полученных в данной работе результатов. Работа выполнена

при финансовой поддержке интеграционного проекта Программы Президиума РАН «Динамичность генофондов, генотипическая и фенотипическая изменчивость в популяции» № 30.33.

ЛИТЕРАТУРА

- Вайсман Н.Я., Илинский Ю.Ю., Голубовский М.Д. Популяционно-генетический анализ продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*: сходные эффекты эндосимбионта *Wolbachia* и онкосупрессора *lgl* в условиях температурного стресса // Журн. общ. биологии. 2009. Т. 70. № 5. С. 438–447.
- Кашнер Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях. Л.: Мир, 1981. 522 с.
- Жукова М.В., Воронин Д.А., Киселева Е.В. Изменение ультраструктуры симбиотических бактерий *Wolbachia* в яичниках и ранних эмбрионах *Drosophila* под влиянием повышенной температуры // Цитология. 2008. Т. 50. № 12. С. 1050–1060.
- Bordenstein S.R., Bordenstein S.R. Temperature affects the tripartite interactions between bacteriophage WO, *Wolbachia*, and cytoplasmic incompatibility // PLoS One. 2011. V. 6. e29106.
- Chapman R.F., Page W.W. Factors affecting the mortality of the grasshopper, *Zonocerus variegatus*, in Southern Nigeria // J. Anim. Ecol. 1979. V. 48. P. 271–288.
- Clark M.E., Anderson C., Cande J., Karr T.L. Widespread prevalence of *Wolbachia* in laboratory stocks and the implications for *Drosophila* research // Genetics. 2005. V. 170. P. 1667–1675.
- Cossins A., Bowler K. Temperature Biology of Animals. London: Chapman and Hall, 1987. 339 p.
- Dobson S.L., Bourtzis K., Braig H.R. *et al.* *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues // Insect. Biochem. Mol. Biol. 1999. V. 29. P. 153–160.
- Hayes S.F., Burgdorfer W. Reactivation of *Rickettsia rickettsii* in *Dermacentor andersoni* ticks: an ultrastructural analysis // Infect. Immun. 1982. V. 37. P. 779–785.
- Kozek W.J. What is new in the *Wolbachia/Dirofilaria* interaction? // Vet. Parasitol. 2005. V. 133. P. 127–132.
- Loesel R., Nässel D.R., Strausfeld N.J. Common design in a unique midline neuropil in the brains of arthropods // Arthropod Struct. Dev. 2002. V. 31. P. 77–91.
- McGraw E.A., Merritt D.J., Droller J.N., O'Neill S.L. *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host // Proc. Natl Acad. Sci. US. 2002. V. 99. P. 2918–2923.
- Min K.T., Benzer S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 10792–10796.
- McMeniman C.J., Lane R.V., Cass B.N. *et al.* Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti* // Science. 2009. V. 323. P. 141–144.
- Moreira L.A., Iturbe-Ormaetxe I., Jeffery J.A. *et al.* A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium* // Cell. 2009. V. 139. P. 1268–1278.
- Petavy G., David J.R., Gilbert P., Moreteau B. Viability and rate of development at different temperatures in *Drosophila*: a comparison of constant and alternating thermal regimes // J. Therm. Biol. 2001. V. 26. P. 29–39.
- Pintureau B., Pizzol J., Bolland P. Effects of endosymbiotic *Wolbachia* on the diapause in *Trichogramma* hosts and effects of the diapause on *Wolbachia* // Entomol. Exp. Appl. 2003. V. 106. P. 193–200.
- Precht H.J., Christophersen H., Hensel H., Larcher W. Temperature and Life. Berlin: Springer-Verlag, 1973. 514 p.
- Rasgon J.L., Gamston C.E., Ren X. Survival of *Wolbachia pipientis* in cell-free medium // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 6934–6937.
- Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain for electron microscopy // J. Cell Biol. 1963. V. 17. P. 208–212.
- Serbus L.R., Casper-Lindley C., Landmann F., Sullivan W. The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions // Annu. Rev. Genet. 2008. V. 42. P. 683–707.
- Terasaki M., Runft L.L., Hand A.R. Changes in organization of the endoplasmic reticulum during *Xenopus* oocyte maturation and activation // Mol. Biol. Cell. 2001. V. 12. P. 1103–1116.
- Thomas M.B., Blanford S. Thermal biology in insect-parasite interactions // Trends Ecol. Evol. 2003. V. 18. No. 7. P. 344–350.
- van Opijnen T.V., Breeuwer J.A.J. High temperatures eliminate *Wolbachia*, a cytoplasmic incompatibility inducing endosymbiont, from the two-spotted spider mite // Exp. Appl. Acarol. 1999. V. 23. P. 871–881.
- Wiwatanaratnabutr I., Kittayapong P. Effects of crowding and temperature on *Wolbachia* infection density among life cycle stages of *Aedes albopictus* // J. Invertebr. Pathol. 2009. V. 102. P. 220–224.

**EFFECT OF ELEVATED TEMPERATURE
ON THE SURVIVAL OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*
INFECTED WITH A PATHOGENIC *WOLBACHIA* STRAIN**

A.A. Strunov, Yu.Yu. Ilinskii, I.K. Zakharov, E.V. Kiseleva

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: strunov.anton@gmail.com

Summary

The pathogenic *Wolbachia* strain wMelPop is detected in the central nervous system, muscles, and retina of *Drosophila melanogaster*. It reduces the host lifetime twofold. This fact makes it promising for control of insect pests and transmitters of human diseases. Any symbiotic association is exposed to various stress factors: starvation, heat, cold, etc., which affect the symbiont interaction significantly. This study considers the action of cold (16 °C) and heat (29 °C) on the survival and lifetime of *D. melanogaster* females infected by the *Wolbachia* strain wMelPop. The ultrastructure of brain cells and the bacterium distribution in them were studied. Longer (starting from three days) exposure of imagoes to elevated temperature reduces their lifetime. On day 7 of exposure to heat, electron-dense bodies appear in brain cells of the flies. They look like degrading bacteria. Their amount increases dramatically by day 13 of incubation at 29 °C. On the grounds of populational and EM analysis, we recognized the critical time of heat action: days 7–13 after the start of exposure. After that, the survival of *Drosophila melanogaster* decreases abruptly.

Key words: *Drosophila melanogaster*, pathogenic *Wolbachia* strain wMelPop, electron microscopy, elevated temperature.