

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Біологічний факультет

Кафедра генетики і цитології

До захисту допущено

Кафедрою генетики і цитології протокол № _____ від _____

завідувач кафедри 
(підпис)

Наталя ВОЛКОВА
(ім'я, прізвище)

«11» грудня 2025 р.

Кваліфікаційна робота
здобувача другого (магістерського) рівня вищої освіти

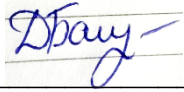
**Характеристика ембріональної смертності ліній дикого типу
Canton-S Drosophila melanogaster з різних місць утримання**
(назва роботи)

Спеціальність (спеціалізація) 091 Біологія та біохімія

(код та найменування спеціальності; спеціалізації спеціальності - за наявності)

Освітня програма

Генетика
(назва освітньої програми)

Виконавець 
(підпис)

Даріна БАШТЕНКО
(ім'я, прізвище)

Науковий керівник 
(підпис)

Наталя ВОЛКОВА
(ім'я, прізвище)

Харків – 2025

АНОТАЦІЯ

Робота викладена на 58 сторінках друкованого тексту, містить 10 таблиць, 15 рисунків та 53 джерела літератури.

Дане дослідження присвячене оцінці генетичного стану ліній дикого типу, які широко використовують у генетичних, еволюційних та молекулярних дослідженнях. Інформація про рівень ембріональної смертності, наявність *hobo* елемента та інфікованість *Wolbachia* дозволяють оцінювати стабільність лабораторних культур та прогнозувати їхню придатність для подальших експериментів. Практичне значення полягає у можливості застосувати результати для оптимізації умов утримання ліній *Canton-S* у лабораторіях, контролю генетичної чистоти стандартних ліній, попередження небажаного накопичення мутацій у дослідних популяціях, покращення відтворюваності експериментів, де використовуються лінії *Canton-S* як еталонні.

За результатами проведеного дослідження для двох лабораторних ліній *Canton-S* та *Canton-S M* з колекції кафедри генетики і цитології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна були встановлені поточні значення показників ембріональної смертності, частоти атрофії гонад, статус щодо наявності в геномі представників мобільного генетичного елемента *hobo* та інфікованість особин бактерією *Wolbachia*. Встановлено, що в лінії *Canton-S M* практично всі особини мають в геномі мобільний генетичний елемент *hobo*. Тоді як він реєструється лише у окремих представників лінії *Canton-S*. Встановлено, що особини лінії *Canton-S M* інфіковані *Wolbachia*. Тоді як представники лінії *Canton-S* – ні. У самок обох ліній, а також у самок-гібридів від схрещування ♀ *Canton-S M* × ♂ *Canton-S* зареєстровано високу частоту атрофії гонад (понад 33%). Показники для самців з відповідних досліджених вибірок статистично значно нижчі. Встановлено, що *Canton-S* та *Canton-S M* мають статистично значущі відмінності в частоті ранніх ембріональних леталей

і в частоті ембріональних леталей загалом, але не в частоті пізніх ембріональних леталей. Ембріональна смертність на ранніх термінах та загальна серед нащадків від міжлінійних схрещувань незалежно від напрямку схрещувань характеризується проміжними значеннями у порівнянні з обома батьківськими лініями. Нащадки схрещування ♀ *C-S M* × ♂ *C-S* упродовж двох поколінь характеризуються стабільним рівнем ембріональної смертності в різні періоди ембріогенезу. Серед нащадків схрещування ♀ *C-S* × ♂ *C-S M* в другому поколінні має місце істотне зниження смертності у всіх періодах ембріогенезу у порівнянні з нащадками першого покоління.

Ключові слова: дрозофіла, ембріональна смертність, мобільний генетичний елемент *hobo*, бактерія *Wolbachia*.

ANNOTATION

This study is devoted to assessing the genetic status of wild-type stocks widely used in genetic, evolutionary, and molecular research. Information on embryonic mortality rates, the presence of the *hobo* element, and *Wolbachia* infection allows us to assess the stability of laboratory cultures and predict their suitability for further experiments. The practical significance lies in the possibility of applying the results to optimize the conditions for keeping *Canton-S* stocks in laboratories, control the genetic purity of standard lines, prevent unwanted accumulation of mutations in experimental populations, and improve the reproducibility of experiments where *Canton-S* stocks are used as reference ones.

Based on the results of the study, the current values of embryonic mortality, gonadal atrophy frequency, and the status of the presence of the mobile genetic element *hobo* in the genome were established for two laboratory stocks, *Canton-S* and *Canton-S M*, from the collection of Genetics and Cytology Department of V.N. Karazin Kharkiv National University. It was found that in the *Canton-S M* stock, almost all individuals have the mobile genetic element *hobo* in their genome. Whereas it is registered only in some representatives of the *Canton-S* stock. It was found that individuals of the *Canton-S M* stock are infected with *Wolbachia*. Whereas representatives of the *Canton-S* line are not. In females of both stocks, as well as in female hybrids from the cross ♀ *Canton-S M* × ♂ *Canton-S*, a high frequency of gonadal atrophy (over 33%) was recorded. The indicators for males from the corresponding studied samples are statistically significantly lower. It was found that *Canton-S* and *Canton-S M* have statistically significant differences in the frequency of early embryonic lethality and in the frequency of embryonic lethality in general, but not in the frequency of late embryonic lethality. Early embryonic mortality and overall mortality among offspring from interline crosses, regardless of the direction of the crosses, are characterized by intermediate values compared to both parental lines. The offspring of the ♀ *C-S M* × ♂ *C-S* cross over two generations are

characterized by a stable level of embryonic mortality at different periods of embryogenesis. Among the offspring of the ♀ *C-S* × ♂ *C-S* M cross in the second generation, there is a significant reduction in mortality in all periods of embryogenesis compared to the offspring of the first generation.

Keywords: *Drosophila*, embryonic mortality, *hobo* mobile genetic element, *Wolbachia* bacteria.

Зміст

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	10
1.1 Мобільні генетичні елементи геному	10
1.2 <i>hobo</i> -елемент	12
1.3 Гібридний дисгенез	16
1.4 Загальна характеристика <i>Wolbachia pipientis</i>	20
1.5 Загальна характеристика генів з летальним ефектом	27
1.6 Генетичний контроль розвитку <i>Drosophila melanogaster</i>	27
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	29
2.1 Об'єкт і матеріал дослідження	29
2.2 Схема дослідження	29
2.3 Методики	31
2.3.1 Метод виділення ДНК	31
2.3.2 Метод полімеразної ланцюгової реакції	33
2.3.3 Метод визначення атрофії гонад	36
2.3.4 Метод обліку домінантних летальних мутацій	37
2.3.5 Методи аналізу даних	37
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	39
3.1 Результати постановки ПЛР на <i>hobo</i> -елемент	39
3.2 Результати постановки ПЛР на <i>Wolbachia</i>	40
3.3. Аналіз атрофії гонад у особин досліджуваних ліній та гібридів від схрещувань між ними	43
3.4. Оцінка рівня ембріональної смертності вихідних ліній та гібридів F ₁	44
3.2 Підрахунок кількості яєць і оцінка рівня ембріональної смертності в F ₂	47
3.5 Обговорення отриманих результатів	48
ВИСНОВКИ	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	51

ВСТУП

Drosophila melanogaster є одним із найважливіших модельних об'єктів сучасної генетики, еволюційної біології та молекулярної цитології. Короткий життєвий цикл дрозофіли дозволяє швидко спостерігати за ембріональним розвитком та наслідками генетичних мутацій, що уможливорює швидші експериментальні цикли порівняно з багатьма іншими організмами. Лінії дикого типу, зокрема *Canton-S*, відіграють ключову роль у порівняльних генетичних експериментах, слугуючи стандартом для оцінки нормального розвитку та репродуктивних показників.

Незважаючи на уявну стабільність лабораторних ліній, тривале утримання в різних умовах може призводити до накопичення мутацій, зміни активності мобільних генетичних елементів, порушення мікробіому та варіацій у репродуктивній системі. Одним із чутливих індикаторів таких змін є ембріональна смертність, яка відображає сумарний вплив генетичних дефектів, дисбалансу мобільних елементів, інфекційних агентів та порушень гаметогенезу. Тому аналіз ембріональної життєздатності в різних популяціях або лабораторних лініях *Canton-S* є важливим для оцінки їхнього генетичного стану та стабільності.

Ембріональна смертність у лініях дикого типу може виступати раннім маркером прихованих генетичних та епігенетичних змін, які накопичуються під впливом умов утримання. Особливу увагу привертає активність мобільних генетичних елементів, зокрема *hobo*-елемента, який у разі активації спричиняє гібридний дизгенез та порушення гаметогенезу. Крім того, бактерія *Wolbachia*, що широко поширена серед популяцій *D. melanogaster*, може формувати цитоплазматичну несумісність та підвищувати рівень ранньої ембріональної смертності. Накопичення летальних мутацій також здатне впливати на життєздатність ембріонів, особливо в лініях, які тривалий час підтримуються в ізольованих лабораторних умовах.

У сукупності ці фактори формують складний і мало вивчений комплекс впливів, тому дослідження ембріональної смертності ліній *Canton-S* з різних місць утримання є актуальним як для фундаментальної генетики, так і для практики утримання в лабораторних умовах.

Виконана робота дає важливу інформацію щодо генетичного стану ліній дикого типу, які широко використовують у генетичних, еволюційних та молекулярних дослідженнях. Дані про частоту летальних мутацій, активність *hobo* та інфекцію *Wolbachia* дозволяють оцінювати стабільність лабораторних культур та прогнозувати їхню придатність для подальших експериментів.

Практичне значення полягає у можливості застосувати результати для оптимізації умов утримання ліній *Canton-S* у лабораторіях, контролю генетичної чистоти стандартних ліній, попередження небажаного накопичення мутацій у дослідних популяціях, покращення відтворюваності експериментів, де використовуються лінії *Canton-S* як еталонні.

Мета даного дослідження: комплексно охарактеризувати ембріональну смертність та пов'язані з нею генетичні зміни у ліній *Canton-S*, що утримувались в різних лабораторіях.

Завдання дослідження

1. Експериментальним шляхом оцінити рівень ембріональної смертності (ранньої, пізньої та сумарний) для двох лабораторних ліній дикого типу *Canton-S* різного походження та гібридів від їх схрещувань.
2. Дослідити частоту атрофії гонад у самців і самок досліджуваних ліній та гібридів.
3. Провести генотипування представників ліній на наявність / відсутність в геномі мобільного генетичного елемента *hobo*.
4. Провести генотипування представників ліній на наявність / відсутність інфікування бактерією *Wolbachia*.

Новизна роботи полягає в оновленні даних щодо проведення порівняльного аналізу ембріональної смертності двох ліній дикого типу *Canton-*

S, які тривалий час утримувалися в різних лабораторних умовах, з одночасним вивченням: стану репродуктивних органів (атрофія гонад), наявності та активності *hobo*-елемента, інфікованості бактерією *Wolbachia*, спектра домінантних летальних мутацій.

Наукове та практичне значення результатів полягає в розширенні описів колекційних лабораторних ліній дрозофіл за показниками ембріональної смертності, наявності *hobo*-елемента, *Wolbachia* та характеристики рівня атрофії гонад..

Особистий внесок автора. Автор підібрав публікації з теми дослідження, зібрав первинний матеріал, виконав статистичний аналіз даних.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Мобільні генетичні елементи геному

Мобільні генетичні елементи (МГЕ) — це складові частини геномів як прокаріотів, так і еукаріотів, присутність яких підтверджена в усіх досліджених видах. Попри це, багато аспектів їх функціонування залишаються недостатньо з'ясованими. Зокрема, досі недостатньо досліджено, з якою частотою та у яких масштабах відбувається переміщення МГЕ як у межах однієї популяції, так і між різними популяціями організмів. Ці елементи надзвичайно поширені, проте більшість знань про механізми їх активації, переміщення та регуляції ми отримали саме завдяки експериментам на *Drosophila melanogaster* [1].

Можна виділити п'ять відносно самостійних напрямків, які призвели до народження «мобільної» генетики або уявленню про динамічність геному [2]:

1) цитогенетичні дослідження нестабільності генів і хромосом у кукурудзи, розпочаті Б. МакКлінток в кінці 1940-х і узагальнені в 1950-х рр. у вигляді концепції мобільних елементів (МЕ), здатних регулювати стан генів і викликати хромосомні мутації;

2) дослідження плазмід і епісом у бактерій і відкриття А. Львовим здатності фага лямбда вбудовуватися в геном бактерії *E. coli* в стані профага;

3) відкриття в 1968-1976 рр. у бактерій особливого класу мутацій, викликаних вставками певних інсерційних елементів, які населяють геном бактерій і причетні до горизонтального міжвидового переносу генів у бактерій;

4) дослідження нестабільних генів і відкриття інсерційного мутагенезу в природних популяціях *D. melanogaster*;

5) виділення та молекулярно-цитогенетичний аналіз мобільних диспергованих фракцій ДНК хромосом дрозофіли.

У сучасній генетиці МГЕ відіграють важливу роль як об'єкти дослідження. Вони можуть становити значну частину геномної ДНК, часто, навіть, найбільшу. Завдяки своїй специфічній структурі, МГЕ здатні копіювати себе в геномі господаря й пересуватись як усередині однієї хромосоми, так і між

різними хромосомами. Їх активність може впливати на архітектуру геному, спричиняючи зміни у функціонуванні генів — як шляхом їх деактивації, так і шляхом підвищення експресії. Унаслідок таких переміщень можуть виникати мутації, деякі з яких не мають помітного впливу на життєздатність організму, інші ж можуть бути як корисними з еволюційної точки зору, так і шкідливими. У більшості випадків негативні мутації спричиняють порушення розвитку, стерильність або загибель особини.

У геномі *Drosophila melanogaster* МГЕ займають порівняно скромне місце у співвідношенні з обсягами подібних структур у вищих рослин, ендосимбіотичних бактеріях або навіть у людському геномі (Рис. 1). У дослідженні, проведеному Kaminker та співавт. (2002) [3], після детального аналізу геномної послідовності дрозофіли, було виявлено 85 раніше відомих та 8 нових родин МГЕ. Їх кількість варіювалася від однієї до 146 копій на геном, а загальне число виявлених повнорозмірних і фрагментарних елементів становило 1572 одиниці. Ці елементи охоплюють приблизно 3,86% еухроматичної частини геному.

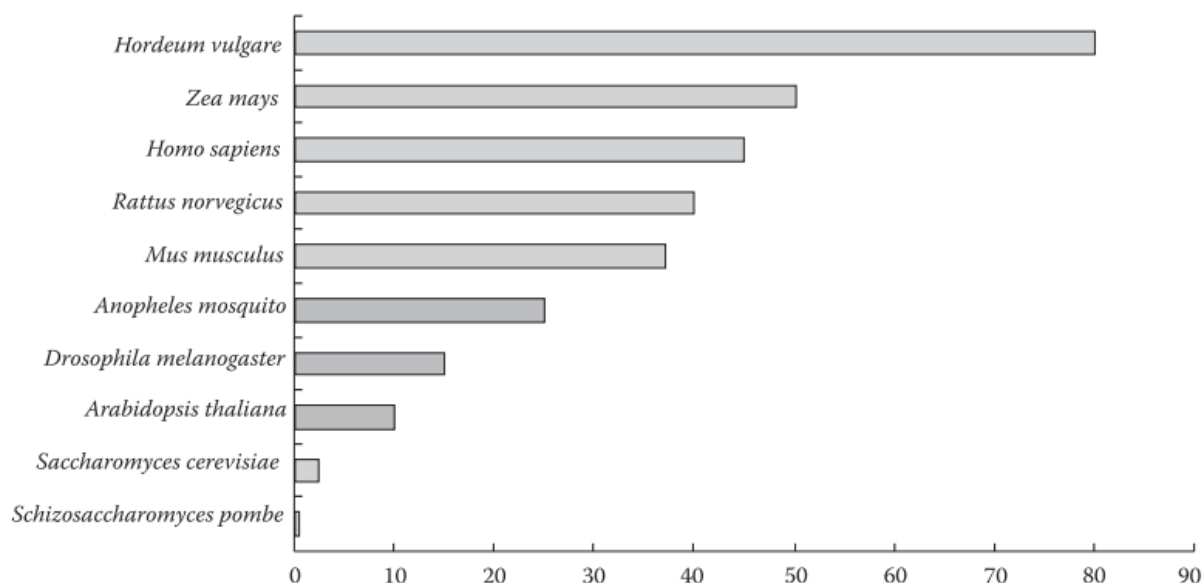


Рис.1. Частка МГЕ у геномі еукаріотів: по вертикалі – організм, по горизонталі – кількість МГЕ, % [1]

Варто зазначити, що більшість з виявлених МГЕ були неповними або фрагментованими. Найбільша концентрація таких елементів спостерігалася в околицях центромер хромосом, де їх щільність перевищувала середню по геному приблизно в 4,7 рази. Також виявлено, що МГЕ *D. melanogaster* мають тенденцію до інтеграції в міжгенні ділянки, що може зменшувати ризик порушення експресії функціональних генів [4].

Особливу увагу привертають мобільні елементи, які здатні спричиняти явище гібридного дисгенезу. До них належать транспозони Р-елемент і *hobo*, а також ретротранспозон — І-елемент. Їхня активація може призводити до генетичної нестабільності, мутацій та репродуктивних розладів у потомства [5,6].

1.2 *hobo*-елемент

Hobo-елементи (Рис. 2) — це родина транспозованих елементів, яка входить до складу суперсімейства hAT (*hobo/Ac/Tam3*) і була виявлена в *Drosophila melanogaster* та трьох її філогенетично близьких видів: *D. simulans*, *D. mauritiana* та *D. sechellia*. *Hobo*-елементи мають здатність викликати явище гібридного дисгенезу в дрозофіли та ефективно колонізують геноми представників цього виду.

Перші успішні клонування та опис транспозона *hobo* були здійснені у дослідженні McGinnis et al. [7], це заклало основу для подальшого вивчення цього мобільного генетичного елемента. Подальший аналіз показав наявність варіантів у нуклеотидній послідовності гена транспозази, що призводить до різниці в амінокислотному складі відповідного білка. Це, своєю чергою, може впливати на ефективність і специфіку мобілізації елемента.

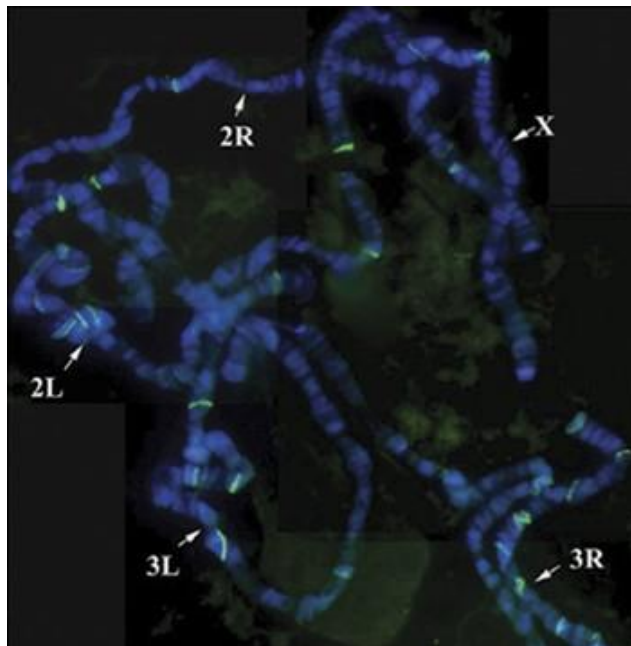


Рис.2. Розміщення *hobo*-елементу в геномі (синій колір – зафарбована ДНК, зелений колір – *hobo*-елемент) [7]

Зі структурної точки зору, типовий *hobo*-елемент складається з:

- термінальних інвертованих повторів (TIRs) — коротких послідовностей на кінцях елемента, які необхідні для впізнавання транспозази;
- гену транспозази, що кодує фермент, здатний вирізати *hobo*-елемент з певної ділянки ДНК і інтегрувати його в інше місце геному, що потенційно може призводити до порушення роботи окремих генів.

Повнорозмірна форма *hobo* має довжину приблизно 3 тис. пар нуклеотидів (тпн) і включає 12-парні інвертовані повтори на кінцях. Після інтеграції в геном, в ділянці приєднання формується 8-парна дуплікація. Такий елемент має дві відкриті рамки зчитування: одна кодує транспозазу з 658 амінокислотами, тоді як призначення другої, коротшої (32 кодони), досі залишається неясним [8].

Крім того, транспозаза *hobo* не тільки каталізує переміщення самого елемента, а й може активувати мобільні елементи інших класів, що вказує на її регуляторну роль у динаміці геному.

Канонічна форма *hobo* містить три амінокислотні повтори TRE (треонін–пролін–глутамінова кислота), кожен з яких закодований дев'ятьма нуклеотидами. Існує гіпотеза, що предковий варіант цього транспозона мав десять таких повторів [8].

Більшість природних популяцій *D. melanogaster* є мономорфними та містять *hobo*-елементи з трьома TRE-повторами. Водночас виявлено також поліморфні популяції (зокрема в Північній Європі, Південній Америці та Екваторіальній Африці), де кількість повторів варіює. На підставі цього дослідники висунули припущення про двофазову інвазію цього транспозона. Перша хвиля, найімовірніше, відбулася ще до формування групи *melanogaster*, і була пов'язана з глобальним поширенням варіантів із трьома TRE. Друга хвиля, за припущенням, стала наслідком горизонтального перенесення генетичного матеріалу, внаслідок чого з'явилися нові типи *hobo* з домінуванням п'яти TRE [9, 10].

Однією з найбільш цікавих особливостей *hobo*-елемента є те, що його поява в геномі *Drosophila melanogaster* відбулася відносно недавно — ймовірно, у середині XX століття. У межах еволюційного часу це дуже короткий період. Дослідники припускають, що інтеграція цього транспозона у геном дрозофіли стала можливою завдяки горизонтальному переносу генетичного матеріалу — тобто від іншого виду, ймовірно, *Drosophila simulans*. Після цієї події *hobo*-елемент швидко поширився серед різних популяцій дрозофіли по всьому світу.

У геномах представників родини дрозофілід *hobo*-елемент трапляється у трьох основних формах [8, 11]:

- 1) повнорозмірні та фрагментарні копії, які можуть бути функціонально активними;
- 2) елементи з внутрішніми делеціями, що частково втратили свою структуру, що унеможлиблює або обмежує їх активність;
- 3) hRS-послідовності (*hobo*-related sequences) — залишки реліктових *hobo*-елементів, що, імовірно, походять від більш ранньої хвилі інвазії, яка трапилася

ще до появи групи *Drosophila melanogaster*. Характеризуються численними делеціями та низьким рівнем гомології з канонічним *hobo*.

Існує припущення, що всі ці типи послідовностей, зокрема навіть неповні чи реліктові, здатні до транспозиції за умови наявності функціонального канонічного *hobo*-елемента, що забезпечує необхідну транспозазу. Також усі три типи відрізняються за довжиною та структурою: дефектні елементи коротші через втрати в генетичній послідовності, а реліктові — значно фрагментовані й змінені. Це вказує на те, що *hobo*-елемент зазнав принаймні кількох хвиль інвазії у геном *D. melanogaster*, з яких одна, ймовірно, є сучасною і ще не завершилася. Проте деталі цього процесу в природних умовах залишаються мало вивченими [11,12].

Крім того, було встановлено, що деякі цис-регуляторні елементи, пов'язані з *hobo*, можуть взаємодіяти з транскрипційними факторами, залученими до регуляції розвитку у дрозоді. Це свідчить про потенційне використання фрагментів *hobo* у процесах еволюційного вдосконалення геномної регуляції, що підкреслює їхню роль не лише як паразитичних елементів, а і як потенційного джерела нових функцій [12].

У популяціях *Drosophila melanogaster* виділяють два основні класи генетичних ліній, що розрізняються за наявністю і структурою *hobo*-елемента. До так званих Н-ліній (від *hobo-positive*) належать генотипи, що містять повнорозмірні копії *hobo* довжиною близько 3 тис. пар нуклеотидів (тпн), а також численні фрагментарні варіанти. У середньому, геном однієї Н-лінії включає від 2 до 10 функціональних *hobo*-елементів і від 30 до 75 дефектних копій.

На відміну від Н-ліній, інші - Е-лінії (від *empty*) - повністю позбавлені повнорозмірних форм *hobo*, хоча можуть містити кілька фрагментованих елементів. Саме ці відмінності є ключовими у виникненні явища гібридного дисгенезу, яке виникає у разі схрещування представників Н- і Е-ліній. У таких гібридів спостерігається підвищена частота мутацій, зокрема хромосомних

перебудов, а також редукція гонад у потомства, що є типовими проявами дисгенезу.

Загальна структура, модель поширення в геномі та генетична поведінка *hobo*-елемента багато в чому нагадують систему Р-елементів, хоча точні причини такої подібності залишаються предметом дискусій у науковій спільноті [12].

1.3 Гібридний дисгенез

Гібридний дисгенез (ГД) у *Drosophila melanogaster* — це синдром генетичної нестабільності, який виникає у гібридному потомстві (F_1) при схрещуванні особин різних ліній, але лише за умови певної реципрочної комбінації батьківських генотипів [13,14,15]. Це класичний приклад контролю активності мобільних елементів за допомогою епігенетичних механізмів, успадкованих від матері [16].

Гібридний дисгенез — це сукупність скорельованих аномальних генетичних ознак, які з'являються у потомства (дисгенних гібридів) [13]:

- 1) висока частота мутацій та хромосомних перебудов [17,18];
- 2) стерильність (безпліддя), особливо гонадальний дисгенез, що проявляється недорозвиненістю або рудиментарним станом яєчників або сім'яників. Прояв стерильності часто є температурозалежним (посилюється при вищих температурах, наприклад, вище 27°C) [13, 14, 19];
- 3) рекомбінація у самців (зазвичай у самців *Drosophila* рекомбінація не відбувається) [20,21,22].

Найбільш вивченою системою ГД є Р-М система, спричинена мобільними елементами Р-типу (Р-elements) — ДНК-транспозонами [13,15,16].

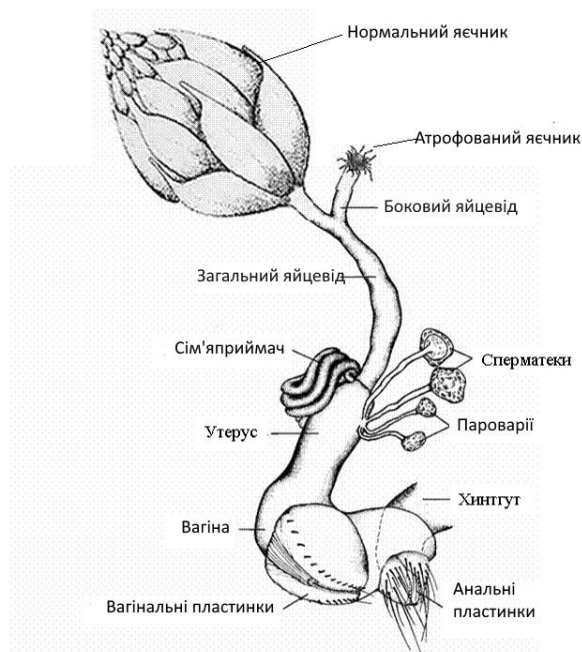


Рис. 3 Морфологія статеві системи самки *Drosophila melanogaster* в умовах синдрому гібридного дисгенезу [23]

Таблиця 1.

**Порівняння Р- та М-ліній у системі гібридного дисгенезу
*Drosophila melanogaster***

Тип Лінії	Характеристика
Р-лінія (Paternal Contributor)	Містить багато копій Р-елементів у геномі. Ці лінії також мають механізми (piRNA) для їх репресії.
М-лінія (Maternal Contributor)	Не містить функціональних Р-елементів. Ці лінії не мають материнських механізмів репресії (piRNA).

Варто відзначити, що активація ново елементів в Н-Е системі гібридного дисгенезу призводить як до недорозвинення гонад у самок і самців F_1 , так і до високого рівня домінантних леталей серед відкладених яєць [20].

Щодо материнського ефекту, то прояв ГД залежить від того, який батько вніс Р-елементи і яка мати внесла цитоплазму (яка містить або ж не містить репресивні фактори), тому існує два види схрещувань (Рис. 4) [15, 16]:

1. Дисгенне схрещування: ♀ *М-лінії* × ♂ *Р-лінії*, результат якого є стерильне, нестабільне потомство. Самець Р-типу вносить Р-елементи, але цитоплазма яйцеклітини М-типу не містить piRNA (Piwi-interacting RNAs), необхідних для глушіння. Р-елементи активно транспонуються у зародковій лінії, викликаючи мутації та стерильність [13].

2. Нейтральне схрещування: ♀ *Р-лінії* × ♂ *М-лінії*, як результат - фертильне, стабільне потомство. Самка Р-типу передає через цитоплазму яйцеклітини регуляторні piRNA. Ці piRNA репресують активність транспозази Р-елементів, запобігаючи їхній мобільності [15].

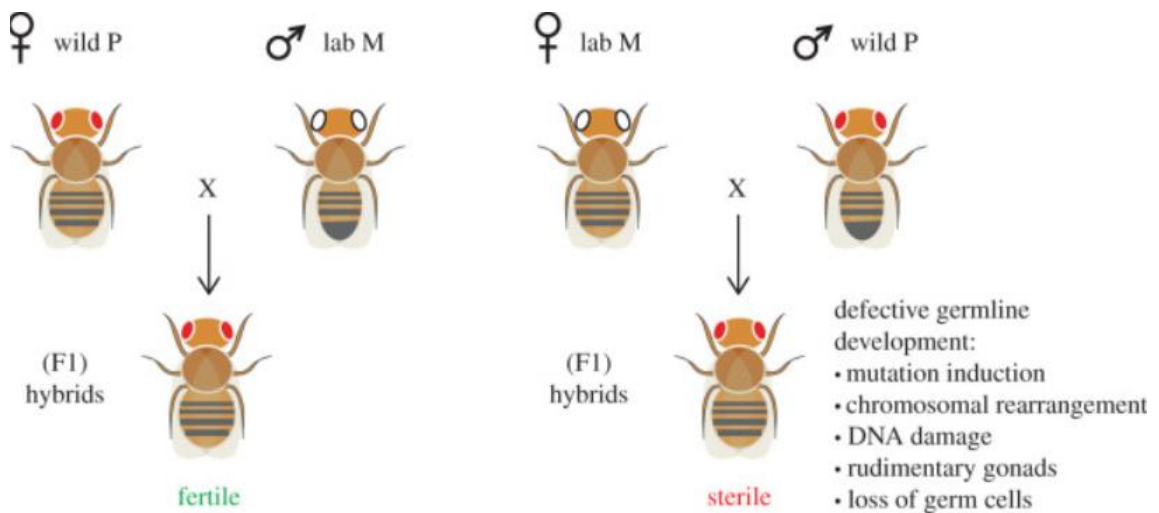


Рис. 4 Схрещування гібридного дисгенезу [24]

Щодо лінії *Canton-S* у контексті гібридного дисгенезу *Drosophila melanogaster*, відомо, що *Canton-S* класифікується як М-лінія (M-strain) [17, 18], а саме через:

1) відсутність Р-елементів: *Canton-S* є референсною М-лінією, оскільки вона не містить функціональних Р-елементів у своєму геномі [17,19]. Ця лінія була отримана з природної популяції у 1940-х роках (до глобального

поширення Р-елемента у природних популяціях *D. melanogaster*, яке відбулося приблизно у 1950-х роках) [18];

2) відсутність цитотипу, тобто як М-лінія, вона не має материнського Р-цитотипу (репресивних piRNA), які б пригнічували транспозицію Р-елементів.

Саме через свій М-статус лінія *Canton-S* традиційно використовується в лабораторіях як референсний тестер для виявлення Р-елементів та індукції дисгенезу. Проводять дисгенне схрещування або контрольні схрещування.

Дисгенне схрещування - коли самців будь-якого досліджуваного Р-штаму схрещують із самками *Canton-S* (М-лінії), отримане потомство F1 демонструє синдром гібридного дисгенезу (стерильність, мутації). Це схрещування ($\text{♀}M \times \text{♂}P$) є стандартним тестом на активність Р-елементів [18].

Атрофія гонад (gonadal atrophy), або гонадальний дисгенез (Gonadal Dysgenesis, GD) у контексті гібридного дисгенезу *Drosophila melanogaster*, є ключовим і найбільш видимим проявом цього синдрому [13, 16].

Атрофія гонад — це недорозвиненість або рудиментарний стан статевих залоз (яєчників у самок та сім'яників у самців), що призводить до стерильності. Це є головною фенотиповою ознакою, що використовується для кількісної оцінки гібридного дисгенезу (ГД) [16].

Вона виникає, коли Р-елементи активно транспонуються у зародковій лінії потомства. Причиною є те, що при дисгенному схрещуванні ($\text{♀}M \times \text{♂}P$) цитоплазма яйцеклітини не містить материнських регуляторних piRNA. Як наслідок, без цього материнського захисту транспозаза, закодована Р-елементами, вільно експресується, що спричиняє множинні вставки Р-елементів у геном клітин зародкової лінії [15].

Атрофія гонад у дисгенних гібридів має характерні риси [13]:

- у самок найчастіше проявляється як повна відсутність яйцекладу (стерильність) або наявність лише рудиментарних, атрофованих яєчників, у яких не завершується розвиток фолікулів;

- у самців стерильність менш виражена, але також спостерігається рудиментарний стан сім'яників.

Прояв гонадального дисгенезу є сильно температурозалежним. Вищі температури розвитку (близько 27° С і вище) значно посилюють прояв стерильності, тоді як нижчі температури (18° С) можуть дозволити розвиток фертильних гонад [16]. Це пов'язано з тим, що активність транспозази Р-елемента є більш високою при підвищеній температурі.

1.4 Загальна характеристика *Wolbachia pipientis*

Wolbachia — це рід грамнегативних, плеоморфних бактерій, здатних змінювати свою морфологічну форму. Вони є облігатними внутрішньоклітинними симбіонтами, що мешкають переважно в клітинах комах та філярій. За оцінками дослідників, ці бактерії виявлено у 25–70 % видів комах. Вперше *Wolbachia* була виявлена у 1924 році в організмі комара *Culex pipiens*, а її формальний опис з'явився у 1936 році [25,26].



Рис. 5 *Wolbachia pipientis* [27]

Точний спектр потенційних хазяїв *Wolbachia* досі залишається недостатньо з'ясованим. Широке поширення цього симбіонта можна пояснити різноманіттю фенотипічних ефектів, які він викликає в організмах-господарях — від взаємовигідного симбіозу до репродуктивного паразитизму. Серед типових проявів інфекції — індукція партеногенезу, маніпуляція статевим визначенням, селективне знищення самців, зміна конкурентоспроможності

сперматозоїдів і цитоплазматична несумісність у ранніх стадіях ембріогенезу. Саме через таку незвичну біологічну поведінку *Wolbachia* стала об'єктом значного наукового інтересу — як з точки зору еволюції, так і з огляду на її потенційне застосування в біологічному контролі популяцій шкідників та переносників хвороб.

Рід *Wolbachia* включає лише один визнаний вид — *Wolbachia pipientis* (Рис. 6). У минулому до нього також відносили *Wolbachia persica* і *Wolbachia melophagi*, однак згодом ці бактерії було перекласифіковано: першу — як *Francisella persica*, яку віднесли до гамма-протеобактерій, а другу — до родини *Anaplasmataceae*. Попри це, деякі дослідники висувають аргументи щодо доцільності повернення цих таксонів до складу роду *Wolbachia* [25,28].

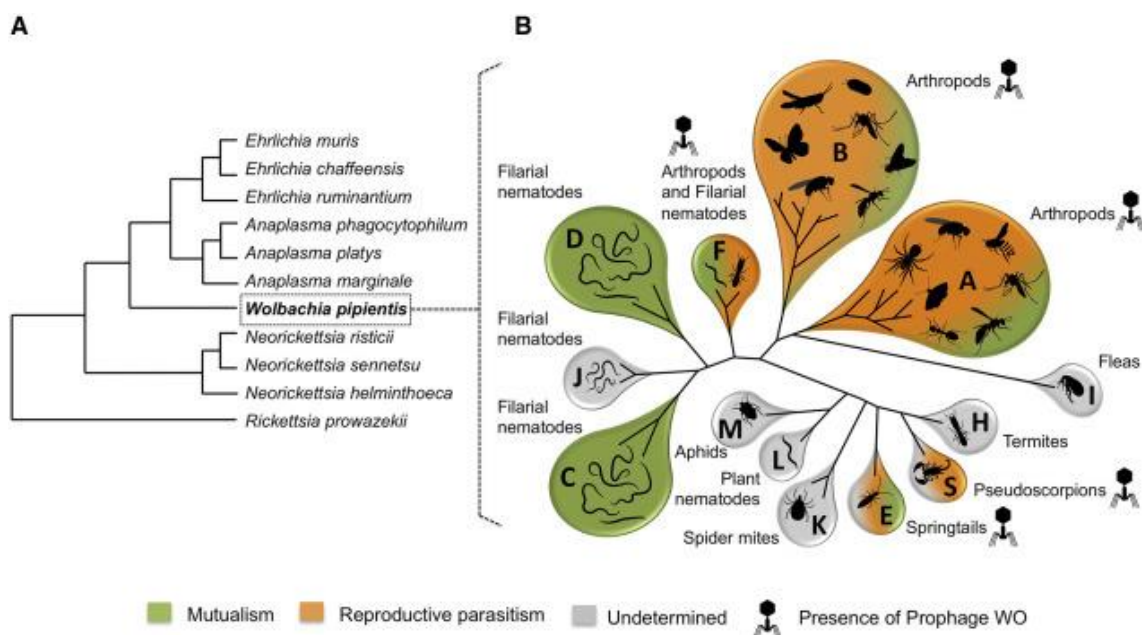


Рис. 6 Філогенія та еволюція *Wolbachia* [28]

У *Wolbachia pipientis* розрізняють три морфологічні типи клітин: невеликі паличкоподібні (0,5–1,3 мкм завдовжки), кокоподібні (діаметром 0,25–1 мкм), а також великі палички (діаметром до 1,8 мкм). Незважаючи на приналежність до грамнегативних бактерій, вони погано піддаються класичному грамовому забарвленню, натомість добре фарбуються за методикою Романовського–Гімзи.

Розмноження *Wolbachia* відбувається внутрішньоклітинно — у вакуолях клітин хазяїв. Спроби вирощування цих бактерій на штучних поживних середовищах були безуспішними: вони культивуються виключно у клітинних культурах комах.

Однією з ключових особливостей *Wolbachia* є її здатність до репродуктивного паразитизму — мікробіологічного явища, при якому мікроорганізм змінює механізми розмноження свого хазяїна задля власного поширення. Цей симбіонт є надзвичайно поширеним у природних популяціях *Drosophila*, за різними оцінками, до 80 % особин несуть інфекцію. У лабораторних лініях *Drosophila melanogaster* рівень інфікованості сягає понад 60 %, що означає, що багато дослідів на дрозофілах проводяться з мимовільною участю *Wolbachia* (Рис. 7).

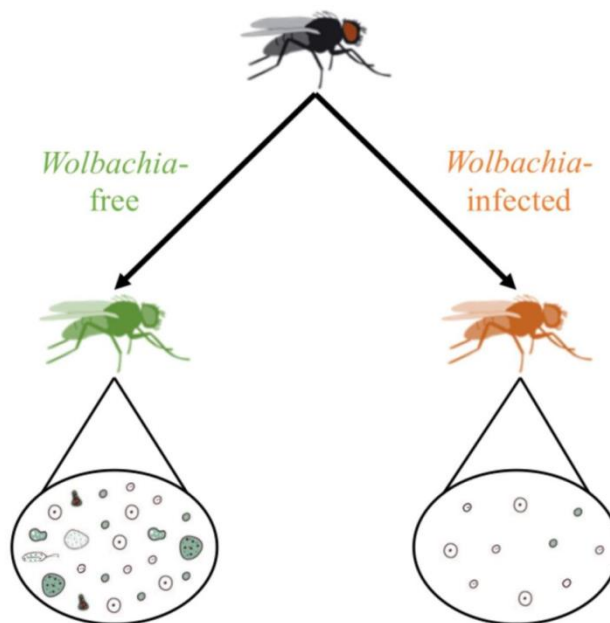


Рис. 7 Інфікування *Wolbachia pipientis Drosophila* [25].

Попри детальне вивчення *Wolbachia pipientis* як агента, що маніпулює розмноженням хазяїна, її вплив на інші аспекти фізіології комах лишається неповністю з'ясованим. Зокрема, існують докази, що *Wolbachia* може мати

симбіотичну роль, підвищуючи стійкість хазяїна до різноманітних стресів, зокрема вірусних та бактеріальних інфекцій. Проте механізми її взаємодії з геномом хазяїна залишаються предметом досліджень [29].

Передача бактерії відбувається материнським шляхом — через яйцеклітину, що зумовлює обов'язкову присутність *Wolbachia* в репродуктивних тканинах жіночих особин.

Як активний маніпулятор репродукції, *Wolbachia* застосовує кілька біологічних стратегій для збільшення свого поширення (Рис.8,9):

1. Цитоплазматична несумісність (CI) — найбільш поширений механізм. Якщо інфікований самець схрещується з неінфікованою самкою, запліднення відбувається, але розвиток ембріона зупиняється. Натомість, у парі, де обидва партнери інфіковані, нащадки розвиваються нормально. Це забезпечує селективну перевагу інфікованим самкам [30,31].

2. Партеногенез — у певних видів паразитичних ос бактерія стимулює розвиток незапліднених яйцеклітин, що призводить до народження лише самок [32].

3. Фемінізація — у деяких ракоподібних, зокрема ізопод, *Wolbachia* змінює статевий розвиток, перетворюючи генетичних самців на самок [33].

4. Летальність самців — у деяких видів бактерія спричиняє загибель ембріонів чоловічої статі, що призводить до зсуву статевого співвідношення на користь самок [34].

Ці стратегії забезпечують домінування жіночих особин у популяціях, що сприяє ефективнішій передачі *Wolbachia* наступному поколінню.

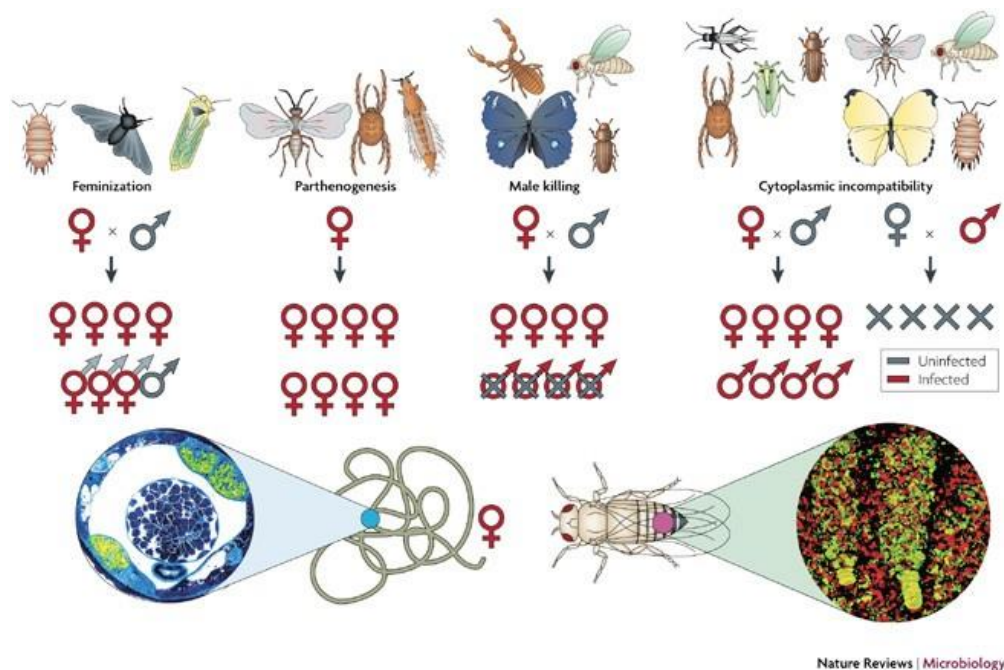


Рис.8 Фенотипи, що утворюються внаслідок зараження комах *Wolbachia* [35]

Як симбіонт, *Wolbachia* впливає на здатність дрізофіли протистояти інфекціям. Недавні дослідження показали, що присутність штаму *Wolbachia wMel* у *Drosophila melanogaster* надає стійкості до інфекції, спричиненої різними РНК-вірусами (вірусом дрізофіли С, вірусом Flock House та вірусом Nora) [36], але не внутрішньоклітинними бактеріальними патогенами (*Salmonella typhimurium* та *Listeria monocytogenes* [37] або паразитоїдними осама (*Leptopilina boulardi*) [38].

Серед різноманітних репродуктивних фенотипів, спричинених *Wolbachia*, найпоширенішим і найкраще дослідженим є цитоплазматична несумісність (cytoplasmic incompatibility CI), що проявляється у двох основних формах: односпрямована та двонаправлена. У першому випадку ембріональна летальність спостерігається внаслідок схрещування інфікованих самців із неінфікованими самками [26]. У випадку двонаправленої CI несумісність виникає між хазяями, зараженими різними штамми *Wolbachia*, які не здатні взаємно нейтралізувати індукований ефект, що також призводить до загибелі ембріонів.

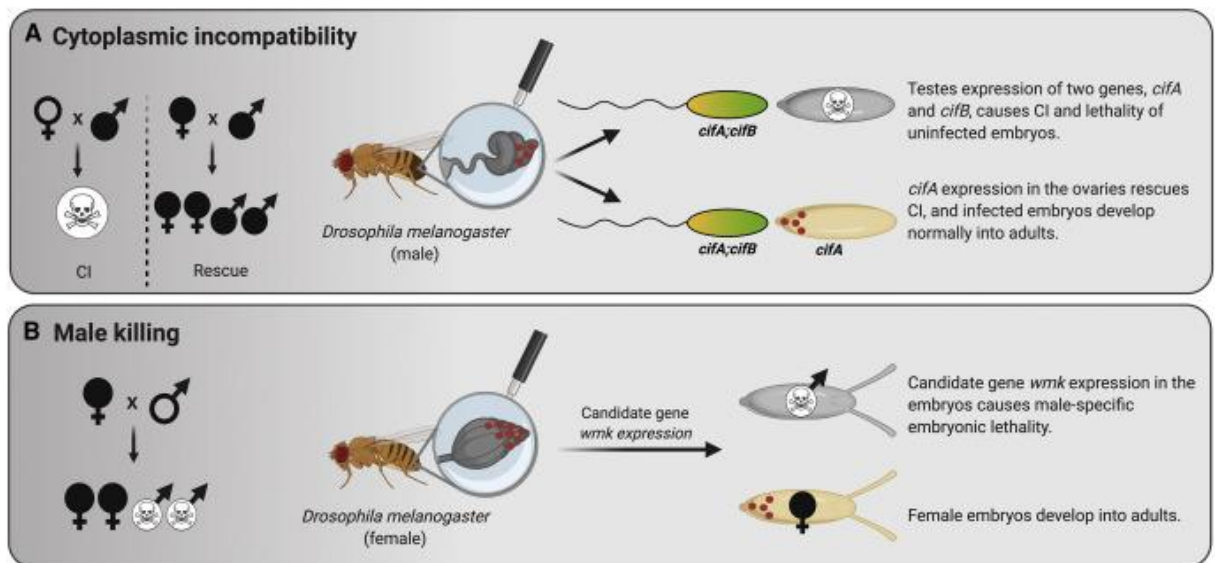


Рис. 9 А – цитоплазматична несумісність, В – смертність нащадків чоловічої статі [29]

На цитологічному рівні це супроводжується порушенням синхронізації між чоловічим і жіночим пронуклеусами на початку першого мітозу. Зокрема, спостерігається затримка розпаду ядерної оболонки сперматозоїдного ядра та фосфорилування гістону H3 — важливого етапу, необхідного для активації мітотичної кінрази Cdk1. У результаті хромосоми жіночого походження проходять нормальну сегрегацію, тоді як чоловічі демонструють хроматинові містки та неправильну сегрегацію, що, у свою чергу, зумовлює зупинку розвитку ембріона на ранніх стадіях[39].

Механізм цитоплазматичної несумісності, спричиненої *Wolbachia*, можна проілюструвати на основі чотирьох можливих варіантів спарювання між інфікованими та неінфікованими особинами (Рис. 10) [40]. Інфіковані самки (умовно позначені синім кольором) незалежно від інфекційного статусу самця завжди продукують інфіковане, життєздатне потомство. Неінфіковані самці можуть успішно схрещуватися як з інфікованими, так і з неінфікованими самками, без наслідків для розвитку потомства.

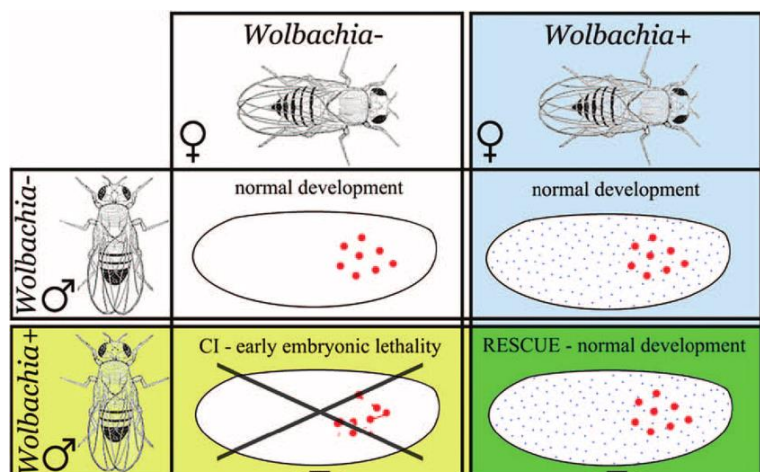


Рис.10 Цитоплазматична несумісність [34]

Проте ключовим є випадок, коли інфікований самець (позначений жовтим) з модифікованими сперматозоїдами під впливом *Wolbachia* схрещується з неінфікованою самкою. У такій комбінації частина ембріонів зазнає ранньої ембріональної летальності, пов'язаної з порушеннями мітотичного поділу. Зокрема, на пізній стадії телофази ядра демонструють аномалії у розподілі хромосом, які не розходяться належним чином під час анафази/телофази.

Ці аномалії не проявляються при схрещуванні інфікованих самців з інфікованими самками, оскільки інфекція в матері компенсує порушення — механізм так званого «відновлення» CI.

У візуалізованих мікроскопічних зображеннях бактерії *Wolbachia* з'являються як численні дрібні крапкові структури, зосереджені біля астральних мікротрубочок. Для позначення структур застосовується забарвлення: червоним позначено ДНК, а зеленим — тубулін. Масштабна лінія відповідає 10 мкм.

1.5 Загальна характеристика генів з летальним ефектом

Летальні гени, або правильніше летальні алелі — це мутантні алелі генів, які можуть призводити до смерті організмів. Такі алелі можуть бути домінантними чи рецесивними, але призводять до смерті організму переважно в гомозиготному стані. За умов рецесивної летальності організми-носії обох летальних алелів можуть гинути ще на стадії ембріонального розвитку, тоді розщеплення ознак за другим законом Менделя у першому поколінні відхиляється від 3:1 і становить 2:1 [41].

Фенотиповий ефект летальних алелей серед інших проявляється у загибелі організму за певних умов або на певних етапах розвитку. Найчастіше загибель через леталь відбувається на ембріональних стадіях розвитку, але існують леталі, що викликають загибель, наприклад, при заляльковуванні личинки дрозофіли. Летальні алелі виникають у результаті так званих летальних мутацій — летальність таких мутацій свідчить, що цей ген відповідальний за якусь життєво необхідну функцію [42].

Сублетальними, або напівлетальними називають алелі, патологічний ефект яких частий, але не обов'язковий (тобто перехідні між летальними алелями та алелями, що викликають спадкові хвороби) [42].

1.6 Генетичний контроль розвитку *Drosophila melanogaster*

На даний час всі гени, які контролюють ранній онтогенез у дрозофіли прийнято ділити на 3 групи за їх фенотиповим ефектом на розвиток:

1) гени материнського ефекту або материнські гени, головною функцією яких є контроль формування полярності яйця (позиційної інформації) і становлення його просторових координат;

2) гени сегментації, які визначають число і полярність сегментів ембріона шляхом прочитування позиційної інформації і переведення її у специфічні патерни сегментації;

3) гомеозисні гени, які визначають сутність сегментів, характер і направлення їх диференціювання.

Материнські гени активні під час оогенезу й забезпечують нерівномірний розподіл мРНК у яйці, формуючи позиційну інформацію для ембріонального розвитку [43, 44]:

1) Bicoid (Bcd) визначає передній полюс ембріона і є морфогеном, концентраційний градієнт якого задає розвиток головних структур.

2) Nanos (Nos) локалізується в задньому полюсі й необхідний для формування абдомінальних структур.

Мутації в цих генах є летальними, оскільки призводять до відсутності або неправильного формування передньої чи задньої частини ембріона. Такі алелі класифікують як ембріонально летальні.

Продукти генів сегментації експресуються вже із зиготичного геному й формують сегментну організацію тіла. Їх поділяють на три класи [45]:

- гар-гени (наприклад, *Kruppel*, *hunchback*) — мутації призводять до «випадіння» кількох суміжних сегментів;

- pair-rule-гени (*even-skipped*, *fushi tarazu*) — порушення їхньої роботи викликає втрату парних або непарних сегментів;

- гени полярності сегментів (*engrailed*, *wingless*) — визначають межі сегментів.

Будь-які дефекти в цих генах спричиняють ембріональну летальність через порушення цілісності сегментного патерну.

Гомеозисні або Нох-гени (комплекси *BX-C* і *ANT-C*) регулюють ідентичність сегментів уздовж передньо-задньої осі. *Antennapedia* (*Antp*) — контролює формування грудних придатків, а *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*), *abdominal-B* (*Abd-B*) — відповідають за розвиток задніх сегментів. Мутації цих генів викликають трансформацію одних структур у інші або повну

зупинку розвитку сегментів, що також проявляється як летальний фенотип [46,47].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Об'єкт і матеріал дослідження

Матеріалом дослідження слугувала лабораторна лінія дикого типу *Drosophila melanogaster* з колекції кафедри генетики і цитології біологічного факультету Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна – *Canton-S*, яка за результатами більш ранніх досліджень характеризувалась високим рівнем смертності на пізніх стадіях ембріогенезу, та лінія *Canton-S M*, отримана з університету Людвіга Максиміліана (м. Мюнхен) в Німеччині.

2.2 Схеми дослідження

Для виявлення hobo-елементу було проаналізовано по 7 зразків 3-денних дорослих самок та самців з ліній *Canton-S* та *Canton-S M*. Із кожної особини була виділена ДНК, яку потім піддали полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) із використанням специфічних праймерів до hobo-елементу. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в агарозному гелі та візуалізували під ультрафіолетом для визначення наявності або відсутності hobo-елементу в кожному зразку. Отримані дані у відповіднювали до ліній та статі комах, застосовуючи статистичний аналіз для оцінки відмінностей.

Для виявлення бактерії *Wolbachia* було використано тих самих особин, що й для попереднього дослід (а саме, виділену ДНК), по сім зразків кожної лінії. Із кожної особини була виділена ДНК, яку потім піддали ПЛР із використанням специфічних праймерів до генетичних маркерів *Wolbachia*. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в агарозному гелі та візуалізували під

ультрафіолетом для визначення наявності або відсутності бактерії в кожному зразку. Отримані дані порівнювали між лініями та статтю, застосовуючи статистичний аналіз для оцінки відмінностей.

Для визначення оцінки рівня атрофії гонад у представників ліній незапліднених самок *Canton-S* та *Canton-S M* схрещували з самцями цих самих ліній, або проводили міжлінійні реципрокні схрещування (отримували гібриди), а їхніх нащадків самок і самців збирали в момент вильоту та витримували протягом 3 днів окремо (на тимчасовому поживному середовищі). Далі цих особин було досліджено на наявність/атрофію яєчників чи сім'яників.

Загалом було проаналізовано по 60 самок та самців з наступних схрещувань:

♀ <i>Canton-S</i> × ♂ <i>Canton-S</i> ,	лінії
♀ <i>Canton-S M</i> × ♂ <i>Canton-S M</i>	
♀ <i>Canton-S</i> × ♂ <i>Canton-S M</i> ,	гібриди
♀ <i>Canton-S M</i> × ♂ <i>Canton-S</i> ,	

Задля постановки схрещування для визначення частоти домінантних летальних мутацій перші 2 доби був здійснений відбір особин з двох ліній *D. melanogaster* дикого типу – *Canton-S* та *Canton-S M*, загалом було відібрано окремо самок і самців по 20 особин в кожную пробірку, вийшло 5 пробірок з самками *Canton-S M*, 5 пробірок з самцями *Canton-S M*, 5 пробірок з самками *Canton-S*, і 5 пробірок з самцями *Canton-S*. Відібраних окремо самок і самців було протримано три доби, після цього була здійснена посадка на чашки Петрі з тимчасовим середовищем з додаванням активованого вугілля. Загалом було посаджено: самки генотипу *C-S* схрещувалися з самцями генотипу *C-S M* у співвідношенні 10 самок × 5–7 самців, отримано 6 кладок; самки генотипу *C-S* схрещувалися з самцями генотипу *C-S* також у співвідношенні 10 самок × 5–7 самців, за цією схемою також отримано 6 кладок. Таким чином, було дві комбінації схрещувань, де змінювались лише генотип самця, а кількість отриманих кладок у кожному випадку однакова — по шість. Чашки Петрі були

поміщені в термостат при температурі 23 °С. Через 15-18 годин було отримано та обліковано яйця. Потім через 48 годин обліковували яйця, які не розвинулись.

Також отримані гібриди були посаджені на пробірки зі звичайним середовищем по три самця та три самки для отримання F₁: 4 пробірки ♀ *C-S M* × ♂ *C-S* та 4 пробірки ♀ *C-S* × ♂ *C-S M*. Після отримання F₁ гібридів ♀ *C-S M* × ♂ *C-S* та ♀ *C-S* × ♂ *C-S M* було знову відібрано окремо самок і самців в пробірки з тимчасовим середовищем з додаванням активованого вугілля, засіяного суспензією дріжджів, і протримано 3 доби. Для отримання F₂ вище вказаних гібридів було посаджено на чашки Петрі з тимчасовим середовищем з додаванням активованого вугілля, засіяного суспензією дріжджів по 10 самок і 6 самців, таким чином було отримано 5 чашок Петрі з F₂ від ♀ *C-S M* × ♂ *C-S* та 5 чашок Петрі з F₂ від ♀ *C-S* × ♂ *C-S M*. Чашки Петрі були поміщені в термостат при температурі 23 °С. Через 15-18 годин було отримано та обліковано яйця. Потім через 48 годин обліковували яйця, які не розвинулись.

2.3 Методи

2.3.1 Метод виділення ДНК

Виділення геномної ДНК проводилось з триденних дорослих особин *Drosophila melanogaster* ліній *Canton-S* та *Canton-S M*. Метод ґрунтується на лізисі клітинного матеріалу з подальшим розділенням нуклеїнових кислот і домішкових компонентів. На першому етапі здійснювали руйнування клітинних і ядерних мембран за допомогою відповідного лізуючого буферу, що забезпечувало вивільнення ДНК у розчин. До складу лізисної системи входили компоненти для денатурації білків та стабілізації нуклеїнової кислоти. Після руйнування клітинних структур проводили очищення ДНК від білкових та інших супутніх домішок. Очищення виконували за допомогою сорбційного або іншого загальноприйнятого методу, який дозволяє відокремити нуклеїнову

кислоту від небажаних компонентів та отримати зразок, придатний для подальших молекулярно-біологічних аналізів. На завершальному етапі ДНК елюювали у відповідному буфері або водному розчині [48].

Виділення ДНК виконувалась за наступним алгоритмом:

1. В пробірки об'ємом 1,5 мл покласти зразки *Drosophila melanogaster*, розчавити (подрібнити) скляною паличкою, до них додати 600 мкл Lysing soln., перемішати вміст пробірки перегортанням (5–10 разів).
2. Термостатувати пробірки 10 хв. при температурі 65 °C.
3. В пробірки додати 20 мкл суспензії сорбенту NeoSorb (W) та перемішати на вортексі вручну на протязі 5 хв.
4. Відцентрифугувати пробірки з сумішшю 10 сек при 5000 g.
5. Обережно видалити супернатант за допомогою вакуумного відсмоктувача, не чіпаючи осаду.
6. Додати в пробірку 300 мкл Lysing soln., перемішати вміст пробірки на вортексі.
7. Додати в пробірку 1 мл Buffer soln. Перемішати вміст пробірки на вортексі.
8. Центрифугувати 10 сек при 5000 g.
9. Обережно видалити супернатант, не зачіпаючи осад.
10. Додати в пробірку 1 мл Buffer soln., перемішати вміст пробірки на вортексі, центрифугувати 10 сек при 5000 g і видалити супернатант за допомогою вакуумного відсмоктувача.
11. Повторити пункт 10.
12. Відібрати останню краплю
13. Просушити осад в термостаті при температурі 65 °C протягом 4–5 хв, відкривши пробірку.
14. Додати в пробірку 100 мкл ExtraDNA soln., ретельно перемішати вміст пробірки на вортексі.

15. Термостатувати у твердотільному термостаті 5 хв при 65 °С. Під час нагріву пробірку 2–3 рази обережно розмішати на вортексі.
16. Центрифугувати 1 хвилину при 10000 g.
17. Перенести 80–90 мкл чистого супернатанту з ДНК в чисті пробірку для ПЛР.

2.3.2 Метод полімеразної ланцюгової реакції

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) застосовувалася для виявлення специфічних ДНК-послідовностей, зокрема мобільного елемента *hobo* та бактерії *Wolbachia*, у зразках *Drosophila melanogaster*. Метод ґрунтується на багаторазовому циклічному копіюванні вибраної ділянки ДНК за допомогою термостабільної ДНК-полімерази та пари олігонуклеотидних праймерів, комплементарних до фланкуючих ділянок цільової послідовності [49, 50].

Для ампліфікації використовували виділену із зразків геномну ДНК особин *Drosophila melanogaster* ліній *Canton-S* та *Canton-S M* та набір реагентів Genpак PCR Core: специфічні праймери до досліджуваних маркерів

(для визначення *hobo* елемента - *hobo-F* 5'-GCGCCATACATAATGATTG-3'; *hobo-R* 5'-CTATTGCGAGTTGTTTAG-3';

для визначення *Wolbachia* – *dW16S-R* 5'-AGCTTCGAGTGAACCCAATTTC-3', *dW16S-F* 5'-CATACCTATTTCGAAGGGATAG-3') та стандартні компоненти реакційної суміші, необхідні для функціонування ДНК-полімерази (таблиця 2).

Реакція передбачала послідовні цикли денатурації матричної ДНК, відпалювання праймерів та синтезу нових ланцюгів, що забезпечує експоненційне збільшення кількості копій цільової ділянки. Результати ампліфікації використовували для подальшої оцінки поширеності *hobo*-елемента та інфекції *Wolbachia* у досліджуваних лініях *Drosophila melanogaster*.

Компоненти суміші для ПЛР

Компонент	Об'єм
2× PCR mix	10 мкл
Forward primer	0,5 мкл
Reverse primer	0,5 мкл
DNA template	9 мкл
H ₂ O	До 20 мкл
Олія	1 крапля

Початковою фазою ПЛР є розділення дволанцюгової ДНК, що відбувається при нагріванні зразка до приблизно 94–95 °С. Далі реакційну суміш охолоджують до близько 50 °С, що дає змогу праймерам приєднатися до відповідних ділянок материнських ланцюгів. На наступному етапі, за температури близько 70 °С, ДНК-полімераза добудовує нові нитки, використовуючи наявні у розчині чотири види дезоксинуклеотидтрифосфатів. Подовження нових ланцюгів відбувається одночасно на обох нитках вихідної ДНК. Після завершення цих трьох стадій уся послідовність знову повторюється багато разів для отримання необхідної кількості копій.

Параметри ПЛР: початкова денатурація 94°С, 3 хвилини, наступна денатурація 94°С, 30 с, відпал 54°С, 30 с, синтез 72°С, 1 хвилина 40 с, 35 циклів, елонгація 72°С, 5 хвилин. Використовували ампліфікатор «Терцик».

Було приготовано два набори реакційних сумішей (14 пробірок для виявлення *Wolbachia* і 14 пробірок для виявлення *hobo* елементу).

Отримані продукти ПЛР аналізували методом електрофоретичного розділення при постійній напрузі 120 В у агарозному гелі, що дозволило визначити наявність або відсутність ампліконів характерного розміру для відповідних генетичних маркерів. Для приготування гелю відмірювали 1,8 г агарози, додавали 90 мл буферного розчину та 200 мкл розчину барвника.

Суміш підігрівали до повного розчинення агарози, після чого охолоджували до приблизно 65 °С. Коли температура знижувалася до заданої, у розчин вносили етидієвий барвник. Підготовлену рідку масу заливали у форму для гелю та залишали застигати близько 15 хвилин. Після тверднення гелеву пластину переносили в електрофоретичну камеру й заливали її 1×TBE-буфером.

Далі у сформовані лунки обережно додавали ампліфіковані зразки ДНК, а також маркер молекулярної маси (суміш, що містила 1 мкл TrickTrack буферу, 2 мкл GeneRuler Express DNA Ladder і 4 мкл води) — по 7 мкл кожного. Після цього проводили електрофоретичне розділення при параметрах 80 V, 100 A протягом 50 хвилин. Цей метод дає змогу сортувати великі органічні молекули завдяки різниці швидкостей їх переміщення в гелі під впливом електричного поля.

Одержані дані оцінювали за допомогою транслюмінатора в УФ-спектрі, а зображення гелю фіксували камерою мобільного телефону. Виявлення смуг ампліфікату свідчило про наявність у досліджуваному зразку потрібного ДНК-фрагмента. Орієнтовний розмір фрагментів визначали шляхом зіставлення їхнього положення з маркером GeneRuler Express DNA Ladder.

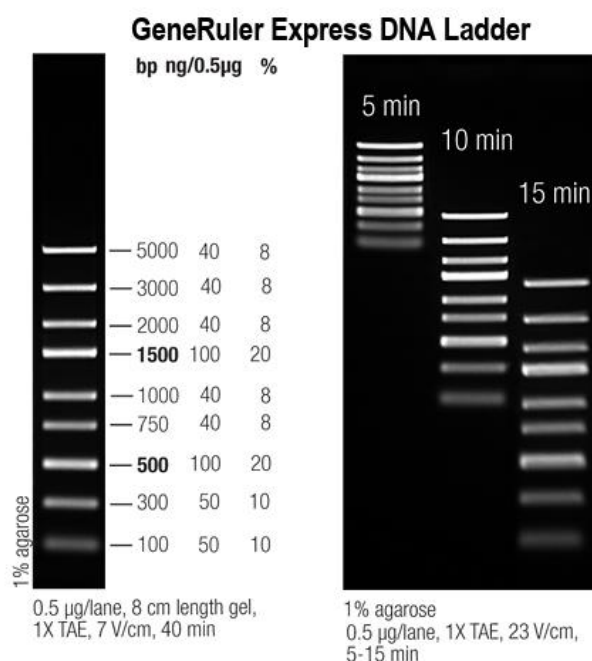


Рис. 11. Маркер молекулярної маси GeneRuler Express DNA Ladder

2.3.3 Метод визначення атрофії гонад

Огляд стану гонад здійснювали за допомогою стереоскопічного мікроскопа. Для цього комах розкривали у краплі води, використовуючи препарувальні голки, після чого органи розмноження визначали шляхом безпосереднього спостереження (Рис. 12).

Далі фіксували кількість особин із однобічним (A1) та повним (A0) припиненням розвитку гонад. Показник атрофії гонад (АГ) розраховували за формулою:

$$\%АГ = \%А0 + \frac{1}{2} \times \%А1.$$

У межах кожного варіанта схрещування аналізували від 2 до 60 мух, при цьому самців і самок обліковували окремо.

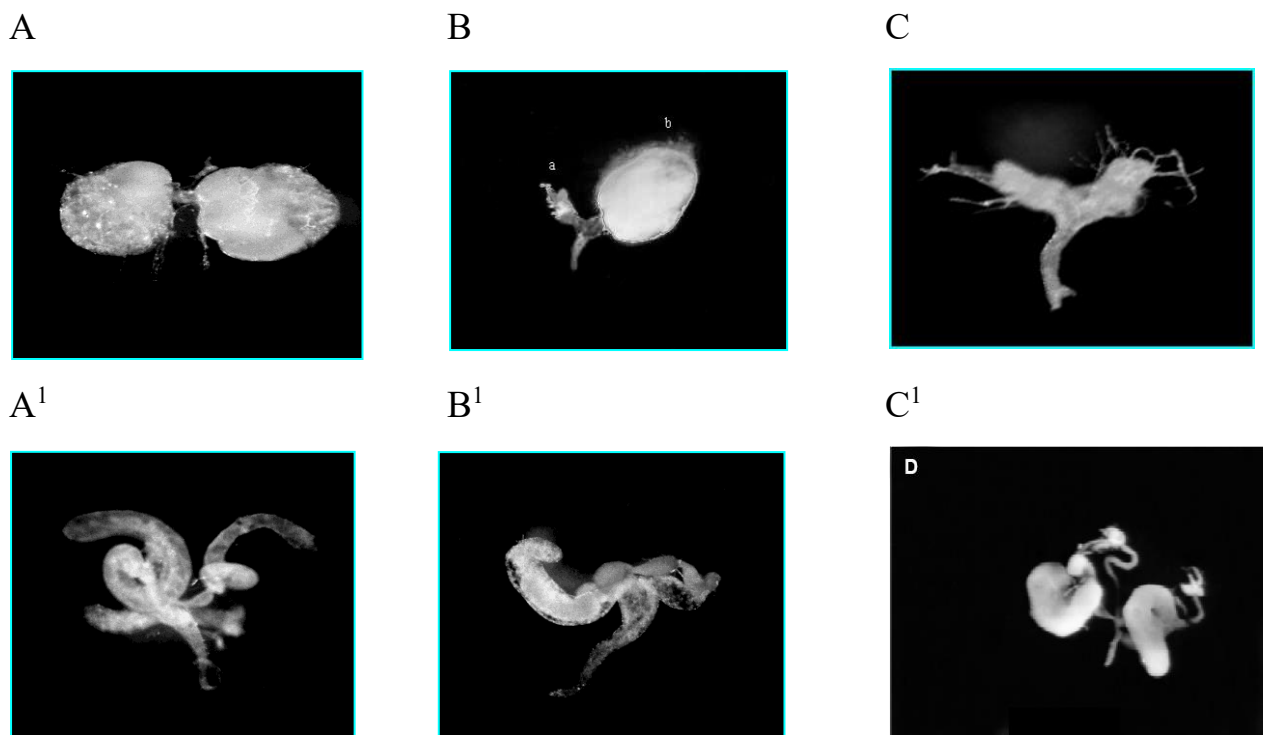


Рис. 12. А, В, С - атрофія гонад у самок, А1, В1, С1 – атрофія гонад у самців *Drosophila melanogaster*: А, А1 - нормальні гонади; В, В1 - одностороння атрофія гонад; С, С1 - двостороння атрофія гонад

2.3.4 Метод обліку домінантних летальних мутацій

У дослідженні було використано метод обліку домінантних летальних мутацій (ДЛМ). Домінантні летальні мутації – це збірна група різноманітних пошкоджень генетичного матеріалу. До такої групи належать анеуплоїдія за аутосомами, асиметричні транслокації, великі делеції, втрата цілих хромосом. Частота виникнення домінантних леталей залежить від стадії сперматогенезу. Відомо, що зрілі сперматозоїди дуже чутливі до впливу пошкоджуючих факторів, оскільки ефективність репарації на цій стадії суттєво знижена або ж репарація не відбувається взагалі.

Цей метод досить простий і не вимагає спеціальних тестерних ліній. З використанням методу ДЛМ виникають проблеми, які, передусім, пов'язані з інтерпретацією, так як генетичні механізми, що викликають ДЛМ, не відомі в кожному конкретному випадку. Тому треба пам'ятати, що, крім порушення власне генетичного матеріалу, нерозвинені зиготи могли бути і незаплідненими яйцеклітинами. Спеціальні дослідження показали, що все-таки більша частка ДЛМ дійсно обумовлена генетичними причинами, проте, щоб це перевірити, необхідно озброїтися цитологічними методами. Показано, що більшість зигот, що не розвилися, – ДЛМ – це анеуплоїдні зиготи або з великими хромосомними перебудовами. Чим раніше гине зигота, тим більша і складніша хромосомна перебудова в ній спостерігається. Сутність даного методу полягає у виявленні індукованих генетичних змін, які виникають у зародкових клітинах батьків і ведуть до загибелі нащадків на різних стадіях ембріонального розвитку [51,52].

2.3.5 Методи аналізу даних

Отримані електрофореграми були піддані аналізу за допомогою програмного забезпечення GelAnalyzer®.

Дані щодо рівня атрофії гонад піддавали статистичному аналізу. Обраховували частку, похибку вибіркової частки. Для порівняння використовували непараметричні критерії [53].

Розрахунки та візуалізацію результатів проводили за допомогою програм Microsoft Excel та Statistica 6.0.

Частоту утворення ембріональних леталей певного типу оцінювали як вибірку частку та виражали у відсотках. Варіювання оцінювали за допомогою довірчого інтервалу. Статистичну значущість відмінностей між вибірковими частками констатували шляхом аналізу перекриття / не перекриття довірчих інтервалів. Для розрахунків використовували онлайн-калькулятор (<https://epitools.ausvet.com.au/ciproportion>)

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Результати постановки ПЛР на *hobo*-елемент

Результати проведення ПЛР на наявність *hobo*-елементу в геномах ліній *Canton-S* і *Canton-S M* (Рис. 13, 14) показали, що лише окремі особини з лінії *Canton-S*, а саме 1 з 7 самок має в геномі відповідну ділянку і 3 з 7 самців (Табл.3).

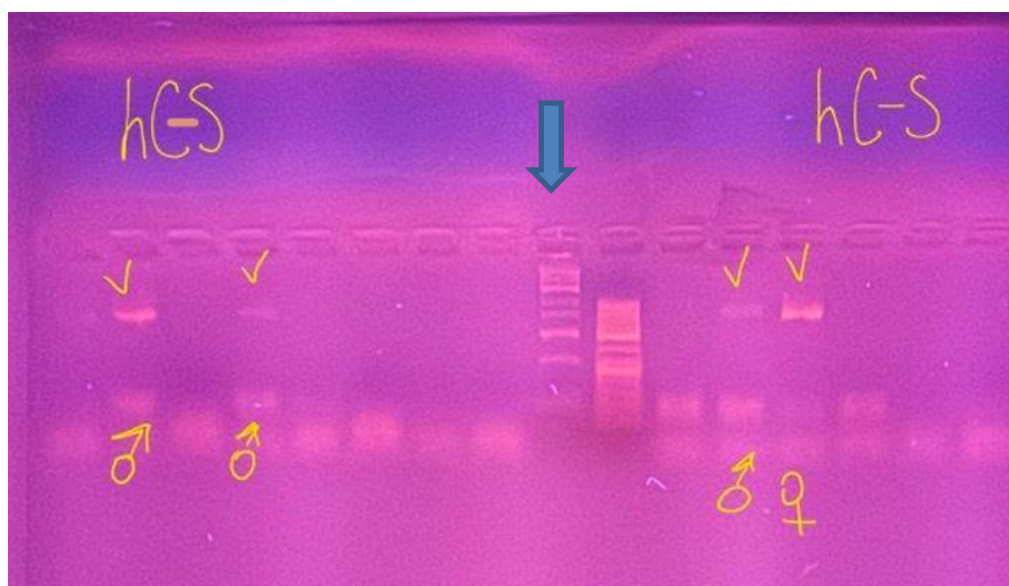


Рис. 13 Електрофореграма результатів ампліфікації *hobo*-елемента в зразках *Canton-S* (стрілкою показано GeneRuler Express DNA Ladder)

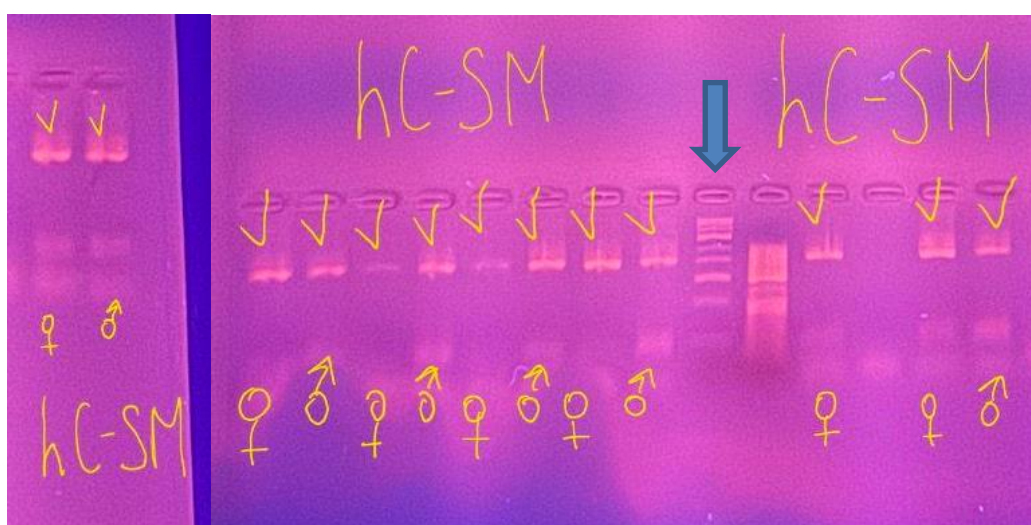


Рис. 14 Електрофореграма результатів ампліфікації *hobo*-елемента в зразках *Canton-S M* (стрілкою показано GeneRuler Express DNA Ladder)

Представники ж лінії *Canton-S M*, навпаки, майже всі характеризувались наявністю в геномі зазначеної ділянки.

Таблиця 3.

Результати генотипування представників досліджуваних ліній на наявність мобільного генетичного елементу *hobo*

Зразки	<i>Canton-S</i>		<i>Canton-S M</i>	
	♀	♂	♀	♂
1	-	+	+	+
2	-	+	+	+
3	-	-	+	+
4	-	-	+	+
5	-	+	+	+
6	+	-	+	-
7	-	-	+	+
Частка	1/7	3/7	7/7	6/7

Відповідно до наявних в літературі відомостей лінію *Canton-S* відносять до Е-ліній. Тобто, до таких, в яких відсутні повнорозмірні варіанти *hobo*-елемента. З огляду на розміри фрагментів, які представлені в маркері молекулярної маси, ампліфікований фрагмент має розмір 750 п.н.

3.2 Результати постановки ПЛР на *Wolbachia*

Результати проведення ПЛР на наявність *Wolbachia* в зразках виділеної ДНК з представників ліній *Canton-S* і *Canton-S M* візуалізовані на (Рис. 15, 16).

У таблиці 4 наведено поосібні результати ПЛР-аналізу на виявлення *Wolbachia* у лініях *Canton-S* та *Canton-S M*. Отримані результати демонструють наявність ампліфікації у більшості зразків лінії *Canton-S M*, тоді як у лінії

Canton-S позитивний результат щодо наявності *Wolbachia* спостерігаються лише у поодиноких випадках. Останнє, насправді, не є типовим. Особливо наявність заражених самців за відсутності заражених самок. Тож потребує більш ґрунтовної перевірки. Вочевидь, лінія *Canton-S M* може бути інфікована *Wolbachia*. Відмінності між самцями та самками не є суттєвими.



Рис. 15. Електрофореграма результатів ампліфікації *Wolbachia* в зразках *Canton-S*

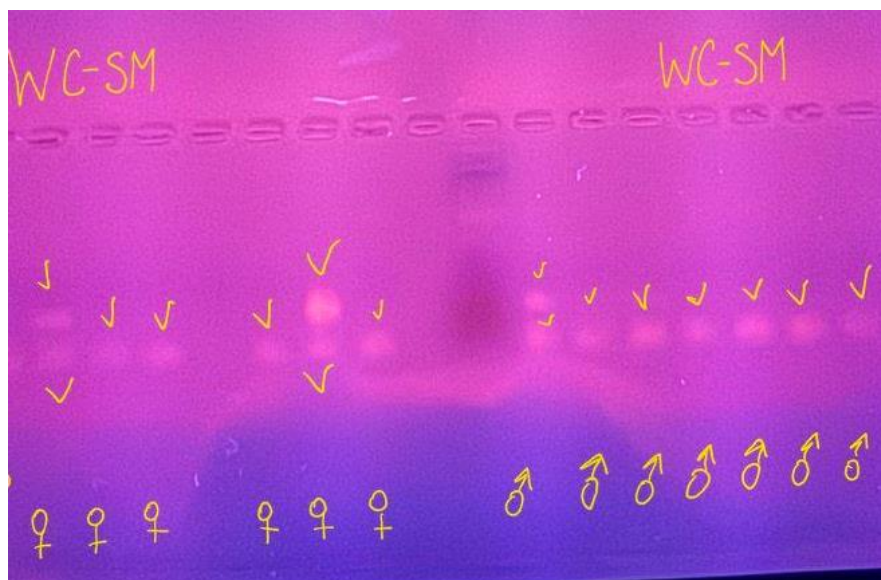


Рис. 15. Електрофореграма результатів ампліфікації *Wolbachia* в зразках *Canton-S M*

Таблиця 4

Результати генотипування представників досліджуваних ліній на наявність *Wolbachia*

Зразки	<i>Canton-S</i>		<i>Canton-S M</i>	
	♀	♂	♀	♂
1	-	-	+	+
2	-	-	+	+
3	-	+	-	+
4	-	-	+	+
5	-	-	+	+
6	-	-	+	+
7	-	+	+	+

Wolbachia — це внутрішньоклітинний мікроорганізм, який виявляється в тілах різних членистоногих (і дрозофіла — не виключення) та нематодах-філяріях. Зазвичай, використовуючи кілька різних стратегій, включно з вбивством самців, індукуванням партеногенезу, викликанням цитоплазматичної несумісності та фемінізацією, а також за допомогою поки що невідомих механізмів, *Wolbachia* здатна впливати на репродуктивну функцію особини-хазяїна, внаслідок чого збільшується її представленість у популяції. *Wolbachia* пов'язана з несумісністю гамет, але також впливає на біологію дрозофіл іншими, менш дослідженими способами. В літературі наявні повідомлення про значне і поширене зараження *Wolbachia* лабораторних колекцій та щодо реального і потенційного впливу на результати оцінки низки показників ліній дрозофіл. Так за інформацією Clark M. зі співавторами станом на 2005 рік приблизно 30% лабораторних ліній, які на той момент зберігались в Блумінгтонському центрі ліній дрозофіли, були заражені *Wolbachia*. Причому клітини як репродуктивних тканин, так і численних соматичних органів містять *Wolbachia* і демонструють значні відмінності в рівнях інфікування як всередині,

так і між обома типами тканин. Ці результати обговорюються з точки зору потенційного впливу *Wolbachia* на придатність хазяїна як матеріалу для проведення певних видів досліджень та необхідності враховувати фактор зараженості/незараженості ліній при аналізі фенотипів.

3.3. Аналіз атрофії гонад у особин досліджуваних ліній та гібридів від схрещувань між ними

Відповідно до отриманих результатів (Таб. 4) виявлено достатньо високу частоту самок з атрофією гонад, як серед представниць ліній так і серед гібридів. Самців з атрофією гонад менше як серед представників ліній, так і серед гібридів, у порівнянні з самками.

Таблиця 4

Показник атрофії гонад у особин досліджуваних ліній та гібридів від схрещувань між ними

	Стать	n (кількість осіб)	++ (норма)	+ - (одностороння атрофія)	- (двостороння атрофія)	АГ (%)	LCL (%)	UCL (%)
<i>Canton-S</i>	♀	60	24	7	29	54,17	45.26	62.81
	♂	60	48	3	9	17,5	11.74	25.28
<i>Canton-S M</i>	♀	60	37	4	18	33,34	25.53	42.17
	♂	60	54	0	6	10	5.81	16.67
♀ <i>Canton-S M</i> × ♂ <i>Canton-S</i>	♀	37	10	18	9	48,65	37.61	59.82
	♂	21	20	0	1	4,76	1.32	15.79
♀ <i>Canton-S</i> × ♂ <i>Canton-S M</i>	♀	2	1	0	1	50	15.0	85.0
	♂	9	8	0	1	11,11	3.10	32.80

Примітка: LCL - нижня межа довірчого інтервалу; UCL – верхня межа довірчого інтервалу.

3.4. Оцінка рівня ембріональної смертності вихідних ліній та гібридів F₁

Загалом було проаналізовано 3275 ембріонів дрозофіли (Табл. 5).

Відповідно до отриманих результатів (Табл. 6), вихідні лінії дикого типу *Drosophila melanogaster* C-S M та C-S характеризуються наявністю статистично значущої різниці за рівнем ранньої ембріональної летальності. При цьому рівень ранньої ембріональної летальності вищий в лінії C-S M. Рівень ранньої ембріональної летальності гібридів проміжний у порівнянні з батьківськими лініями. Між собою гібриди, отримані від реципрокних схрещувань не відрізняються. Відповідно до отриманих результатів можна припустити, що для особин з лінії C-S M характерна як опосередкована яйцеклітиною так і опосередкована сперматозоїдами передача факторів, що спричиняють ранню ембріональну смертність серед гібридів.

Таблиця 5

Характеристика обсягу дослідження (вихідні лінії та гібриди першого покоління)

Тип схрещування	n (кількість яєць)	Ранні ембріональні леталі	Пізні ембріональні леталі	Σ Ранніх і пізніх ембріональних леталей
♀ C-S M × ♂ C-S M	646	62	5	67
♀ C-S M × ♂ C-S	722	34	3	37
♀ C-S × ♂ C-S M	798	48	11	59
♀ C-S × ♂ C-S	1109	28	12	40

Таблиця 6

Характеристика рівня ранньої ембріональної смертності вихідних ліній та гібридів першого покоління

Тип схрещування	Ранні ембріональні леталі (%)	LCL (%)	UCL (%)
♀ <i>C-S M</i> × ♂ <i>C-S M</i>	9,6	7,6	12,1
♀ <i>C-S M</i> × ♂ <i>C-S</i>	4,7	3,4	6,5
♀ <i>C-S</i> × ♂ <i>C-S M</i>	6,0	4,6	7,9
♀ <i>C-S</i> × ♂ <i>C-S</i>	2,5	1,8	3,6

Примітка: LCL - нижня межа довірчого інтервалу; UCL – верхня межа довірчого інтервалу.

Відповідно до отриманих результатів щодо пізньої ембріональної смертності (Табл. 7), вихідні лінії дикого типу *D. melanogaster C-S M* та *C-S* не демонструють статистично значущої відмінності вибірових часток. При цьому рівень пізньої ембріональної летальності трохи вищий в лінії *C-S*.

Таблиця 7

Характеристика рівня пізньої ембріональної смертності вихідних ліній та гібридів першого покоління

Тип схрещування	Пізнні ембріональні леталі (%)	LCL (%)	UCL (%)
♀ <i>C-S M</i> × ♂ <i>C-S M</i>	0,8	0,3	1,8
♀ <i>C-S M</i> × ♂ <i>C-S</i>	0,4	0,1	1,2
♀ <i>C-S</i> × ♂ <i>C-S M</i>	1,4	0,8	2,4
♀ <i>C-S</i> × ♂ <i>C-S</i>	1,1	0,6	1,9

Примітка: LCL - нижня межа довірчого інтервалу; UCL – верхня межа довірчого інтервалу.

Рівень пізньої ембріональної летальності гібридів розширює діапазон мінливості даного показника у порівнянні з батьківськими лініями. Фактично між собою гібриди, отримані від реципрокних схрещувань, не відрізняються і не відрізняються від батьківських ліній. Відповідно до отриманих результатів можна припустити, що для особин вихідних ліній характерна наявність певною мірою відмінних успадковуваних факторів, що спричиняють пізню ембріональну летальність.

За сумарним рівнем ембріональної смертності (Табл. 8), вихідні лінії дикого типу *D. melanogaster* *C-S M* та *C-S* характеризуються наявністю статистично значущої різниці. При цьому рівень ембріональної летальності вищий в лінії *C-S M*. Рівень ранньої ембріональної летальності гібридів проміжний у порівнянні з батьківськими лініями. Між собою гібриди, отримані від реципрокних схрещувань не відрізняються. Порівнюючи гібридів з вихідними лініями, слід відзначити істотний ефект, які привносять особини чоловічої статі у формування високого рівня смертності в лінії *C-S M*.

Таблиця 8

Характеристика загального рівня ембріональної смертності вихідних ліній та гібридів першого покоління

Тип схрещування	Σ Ранніх і пізніх ембріональних леталей (%)	LCL (%)	UCL (%)
$\text{♀ } C-S M \times \text{♂ } C-S M$	10,4	8,2	13,0
$\text{♀ } C-S M \times \text{♂ } C-S$	5,1	3,7	7,1
$\text{♀ } C-S \times \text{♂ } C-S M$	7,4	5,8	9,4
$\text{♀ } C-S \times \text{♂ } C-S$	3,6	2,7	4,9

Примітка: LCL - нижня межа довірчого інтервалу; UCL – верхня межа довірчого інтервалу.

3.2 Підрахунок кількості яєць і оцінка рівня ембріональної смертності в F₂

Від гібридів ♀ *C-S M* × ♂ *C-S* та ♀ *C-S* × ♂ *C-S M* також були отримані кладки яєць (Табл. 9) з метою оцінки ембріональної смертності серед нащадків другого покоління.

Порівнюючи рівні ембріональної смертності серед нащадків другого покоління від реципрокних схрещувань (Табл. 10) з нащадками першого покоління (Табл. 3-5), спостерігаємо, що нащадки схрещування ♀ *C-S M* × ♂ *C-S* упродовж двох поколінь характеризуються стабільним рівнем ембріональної смертності в різні періоди ембріогенезу. Натомість, у нащадків схрещування ♀ *C-S* × ♂ *C-S M* в другому поколінні має місце істотне зниження смертності у всіх періодах ембріогенезу у порівнянні з нащадками першого покоління.

Таблиця 9

Характеристика обсягу дослідження (гібриди другого покоління)

Тип схрещування	n (кількість яєць)	Ранні ембріональні леталі	Пізні ембріональні леталі	Σ Ранніх і пізніх ембріональних леталей
♀ <i>C-S M</i> × ♂ <i>C-S</i>	918	40	6	46
♀ <i>C-S</i> × ♂ <i>C-S M</i>	971	6	1	7

Таблиця 10

Підрахунок рівня ембріональної смертності

Тип схрещування	Ранні ембріональні леталі			Пізні ембріональні леталі			Σ Ранніх і пізніх ембріональних леталей		
	(%)	LCL (%)	UCL (%)	(%)	LCL (%)	UCL (%)	(%)	LCL (%)	UCL (%)
♀ <i>C-S M</i> × ♂ <i>C-S</i>	4,4	3,0	6,0	0,6	0,3	1,0	5,0	4,0	7,0
♀ <i>C-S</i> × ♂ <i>C-S M</i>	0,6	0,3	1	0,1	0,02	0,6	0,7	0,3	1,5

3.5 Обговорення отриманих результатів

Отримані в ході дослідження дані свідчать про те, що лінії *Canton-S* та *Canton-S M*, які тривалий час утримувалися в різних лабораторіях, істотно відрізняються за низкою показників, пов'язаних із ембріональною смертністю та загальною стабільністю геному. Сукупний аналіз результатів, що включає оцінку атрофії гонад, виявлення мобільного *hobo*-елемента, визначення інфікованості *Wolbachia* та частоти летальних мутацій, дозволяє оцінити потенційні механізми формування виявлених відмінностей та встановити їх можливі взаємозв'язки.

Однією з найпомітніших відмінностей є різний рівень ембріональної смертності в досліджуваних лініях. Лінія *Canton-S M* демонструє вищу частку нежиттєздатних ембріонів у певних комбінаціях схрещування, що може відображати накопичення генетичних змін або вплив цитоплазматичних та транспозон-індукованих факторів. Натомість *Canton-S*, виявляє більш рівномірні показники, що свідчить про більшу генетичну однорідність та меншу кількість чинників, здатних порушувати ембріогенез.

Згідно з отриманими результатами ПЛР, саме лінія *Canton-S M* містить копії *hobo*-елемента. Відомо, що при схрещуванні особин, які несуть активні копії мобільних елементів, з лініями, що позбавлені відповідних репресорів, у потомства можуть виникати прояви гібридного дизгенезу. У тих варіантах, де материнська лінія не забезпечує ембріон необхідними супресорними факторами, прояви дизгенезу спостерігаються виразніше. Таким чином, активність *hobo* може бути одним із ключових чинників, які визначають підвищену ембріональну смертність серед частини нащадків.

Іншим важливим компонентом є наявність ендосимбіотичної бактерії *Wolbachia*, частота виявлення якої в лінії *Canton-S M* теж вища. *Wolbachia* здатна спричинювати феномен цитоплазматичної несумісності, коли запліднення яйцеклітини сперматозоїдом інфікованого самця призводить до ранньої ембріональної загибелі, якщо самка не несе того самого штаму бактерії.

Це узгоджується з тим, що у частини комбінацій схрещувань за участю *Canton-S M* було зафіксовано підвищену ембріональну смертність. Оскільки обидва чинники — *hobo* та *Wolbachia* — одночасно присутні в цій лінії, розділити їх внесок у виявлену смертність наразі складно. Проте сама тенденція свідчить, що обидва механізми можуть діяти паралельно та підсилювати один одного.

Дані щодо частоти ранніх летальних мутацій вказують на те, що в частини зародків виникають порушення, несумісні з подальшим розвитком. Це може бути наслідком геномної нестабільності, спричиненої або активністю мобільних елементів, або впливом інших чинників, таких як мутації в генах материнського впливу, що можуть спричинити ембріональну летальність незалежно від генотипу ембріона.

У деяких випадках летальна мутація в геномі зиготи може бути скомпенсована продуктами материнського гена. Якщо мати гетерозиготна за цією мутацією і може забезпечити функціональний генний продукт через яйцеклітину, ембріон може вижити, незважаючи на наявність летальної мутації в зиготі. Певні гени сегментації можуть демонструвати такий спосіб успадкування, коли материнський внесок може тимчасово компенсувати відсутність функції зиготичного гена.

Деякі випадки ембріональної летальності пов'язані з взаємодією між кількома генами, коли жодна мутація одного гена не є єдино відповідальною. Ці випадки можуть включати складні генетичні взаємодії та епістатичні ефекти.

Зіставлення частоти летальних мутацій із наявністю *hobo* підтверджує ймовірний зв'язок між цими явищами: системи гібридного дизгенезу відомі здатністю індукувати хромосомні розриви, неправильні рекомбінаційні події та інші ушкодження, що безпосередньо впливають на життєздатність ембріона.

ВИСНОВКИ

За результатами проведеного дослідження для двох лабораторних ліній *Canton-S* та *Canton-S M* з колекції кафедри генетики і цитології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна були встановлені поточні значення показників ембріональної смертності, частоти атрофії гонад, статус щодо наявності в геномі представників мобільного генетичного елемента *hobo* та інфікованість особин бактерією *Wolbachia*.

1. Встановлено, що в лінії *Canton-S M* практично всі особини мають в геномі мобільний генетичний елемент *hobo*. Тоді як він реєструється лише у окремих представників лінії *Canton-S*.
2. Встановлено, що особини лінії *Canton-S M* інфіковані *Wolbachia*. Тоді як представники лінії *Canton-S* – ні.
3. У самок обох ліній, а також у самок-гібридів від схрещування $\text{♀ } Canton-S M \times \text{♂ } Canton-S$ зареєстровано високу частоту атрофії гонад (понад 33%). Показники для самців з відповідних досліджених вибірок статистично значно нижчі.
4. Встановлено, що *Canton-S* та *Canton-S M* мають статистично значущі відмінності в частоті ранніх ембріональних леталей і в частоті ембріональних леталей загалом, але не в частоті пізніх ембріональних леталей.
5. Ембріональна смертність на ранніх термінах та загальна серед нащадків від міжлінійних схрещувань незалежно від напрямку схрещувань характеризується проміжними значеннями у порівнянні з обома батьківськими лініями.
6. Нашадки схрещування $\text{♀ } C-S M \times \text{♂ } C-S$ упродовж двох поколінь характеризуються стабільним рівнем ембріональної смертності в різні періоди ембріогенезу. Серед нащадків схрещування $\text{♀ } C-S \times \text{♂ } C-S M$ в другому поколінні має місце істотне зниження смертності у всіх періодах ембріогенезу у порівнянні з нащадками першого покоління.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Підпала О.В., Яцишина А.П., Лукаш Л.Л. Мобільні генетичні елементи геному людини: структура, розподіл і функціональна роль. ISSN 0564–3783. Цитологія і генетика. 2008. № 6
2. Бабенко Л. М. Молекулярна біологія: мобільні генетичні елементи. Київ: Наукова думка, 2015. 284 с.
3. Kaminker, J. S., Bergman, C. M., Kronmiller, B., Carlson, J., Svirskas, R., Patel, S., ... & Rubin, G. M. (2002). The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. *Genome Biology*, 3(12), research0084.1–0084.20. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-12-research0084>
4. Ana Teresa Mendes Eugénio. Effects of Environment and Genetic Background on Transposable Element Activity in *Drosophila melanogaster*. *Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento*, 2015.
5. Ghanim GE, Rio DC, Teixeira FK. Mechanism and regulation of P element transposition. *Open Biol.* 2020 Dec;10(12):200244. doi: 10.1098/rsob.200244. Epub 2020 Dec 23. PMID: 33352068; PMCID: PMC7776569.
6. Genetic variation in P-element dysgenic sterility is associated with double-strand break repair and alternative splicing of TE transcripts. *PLOS Genetics*. 2022. URL: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1010080> (дата звернення: 11.10.2025).
7. McGinnis, W., Shermoen, A. W., Beckendorf, S. K. (1983). A transposable element inserted just 5' to a *Drosophila* glue protein gene alters gene expression and chromatin structure. *Cell*, 34(1), 75–84 [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90139-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90139-0)

8. Bonnivard E., Bazin C., Denis B., et al. A scenario for the hobo transposable elements invasion, deduced from the structure of natural populations of *Drosophila melanogaster* using tandem TPE repeats // Genetic Research (Cambridge). – 2000. – Vol. 75. – P. 13–23.

9. Козерецька І.А. Мобільні генетичні елементи *Drosophila melanogaster*, популяційно-генетичний аспект. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2010, том 8, №1.

10. Bonnivard E. High polymorphism of TPE repeats within natural populations of *Drosophila melanogaster*: a gradient of the 5TPE hobo element in Western Europe / E. Bonnivard, C. Bazin, D. Higuier // Mol. Biol. Evol. - 2002. - Vol.19. -P. 2277-2284.

11. Sánchez-Gracia A., Rozas J. Gene and genome duplications in *Drosophila*: different patterns of functional divergence of transposable elements. BMC Evolutionary Biology. – 2011. – Vol. 11. – Article 279.

12. Козерецька Д.І., Серга С.В., Демидова А.С., Шкляр С.Є., Козерецька І.А. Нобо транспозон в природних популяціях *Drosophila melanogaster* України. ННЦ" Інститут біології», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна.

13. Evolution of hybrid dysgenesis determinants in *Drosophila melanogaster*. PNAS. 1983. Vol. 80, № 6. P. 1655–1659. URL: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.80.6.1655> (дата звернення: 11.10.2025).

14. Hybrid Dysgenesis in *Drosophila simulans* Associated with a Rapid Invasion of the P-Element. PMC. 2016. URL: <https://pmc.nih.gov/articles/PMC4794157/> (дата звернення: 11.10.2025).

15. Genetic Interactions Between P Elements Involved in piRNA-Mediated Repression of Hybrid Dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. G3 Genes. 2014. Vol. 4, № 8. P. 1417–1429. URL:

<https://academic.oup.com/g3journal/article/4/8/1417/6025898> (дата звернення: 11.10.2025).

16. Genetic variation in P-element dysgenic sterility is associated with double-strand break repair and alternative splicing of TE transcripts. PLOS Genetics. 2022. URL: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1010080> (дата звернення: 11.10.2025).

17. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: the elimination of P elements through repeated backcrossing to an M-type strain. ResearchGate. URL: https://www.researchgate.net/publication/237187510_Hybrid_dysgenesis_in_Drosophila_melanogaster_the_elimination_of_P_elements_through_repeated_backcrossing_to_an_M-type_strain (дата звернення: 11.10.2025).

18. Вплив зовнішніх факторів на виникнення мутацій у популяції дрозофіл. Гігієна населених місць. URL: [https://www.google.com/search?q=http://www.hygiene-journal.org.ua/site/gnm.nsf/id/B94B0BA18BF1613CC22589180046D84B/\\$file/64_356-368.pdf](https://www.google.com/search?q=http://www.hygiene-journal.org.ua/site/gnm.nsf/id/B94B0BA18BF1613CC22589180046D84B/$file/64_356-368.pdf) (дата звернення: 11.10.2025).

19. Козерецька І. А. Особливості гібридного дисгенезу в системах нестабільності *Drosophila virilis*. URL: https://www.researchgate.net/profile/Iryna-Kozeretska/publication/274133061_Hybrid_dysgenesis_characteristics_in_Drosophila_virilis_instability_systems/links/56323be308ae911fcd48bb20/Hybrid-dysgenesis-characteristics-in-Drosophila-virilis-instability-systems.pdf (дата звернення: 11.10.2025).

20. Paternal Induction of Hybrid Dysgenesis in *Drosophila melanogaster* Is Weakly Correlated with Both P-Element and hobo Element Dosage | G3 Genes|Genomes - Oxford Academic. URL: <https://academic.oup.com/g3journal/article/7/5/1487/6028287> (дата звернення: 11.10.2025).

21. Differences in P element population dynamics between the sibling species *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* - Cambridge University Press. URL: <https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/B5529CB57280755124EF5E6F0DB0F0AF/S0016672300032055a.pdf> (дата звернення: 11.10.2025).
22. Serrato-Capuchina A, Wang J, Earley E, Peede D, Isbell K, Matute DR. Paternally Inherited P-Element Copy Number Affects the Magnitude of Hybrid Dysgenesis in *Drosophila simulans* and *D. melanogaster*. *Genome Biol Evol.* 2020 Jun 1;12(6):808-826. doi: 10.1093/gbe/evaa084. PMID: 32339225; PMCID: PMC7313671.
23. Biology of *Drosophila* / ed. M. Demerec. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1950. 632 p.
24. Ghanim GE, Rio DC, Teixeira FK. Mechanism and regulation of P element transposition. *Open Biol.* 2020 Dec;10(12):200244. doi: 10.1098/rsob.200244. Epub 2020 Dec 23. PMID: 33352068; PMCID: PMC7776569.
25. Матеріал взято з сайту Wolbachia research portal <https://web.archive.org/web/20050615102650/http://wolbachia.sols.uq.edu.au/index.html>
26. Hertig, M. (1936). The rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitol.* 28: 453—486.
27. Wolbachia Virtual Museum of Bacteria URL: <https://web.archive.org/web/20080922101708/http://www.bacteriamuseum.org/species/Wolbachia.shtml>
28. Kaur, R. Living in the endosymbiotic world of Wolbachia / R. Kaur, A. Riegler, C. F. Beekman [та ін.] // *Cell Host & Microbe.* — 2021. — Vol. 29, No. 8. — P. 1073-1086. — DOI: 10.1016/j.chom.2021.08.009.

29. Городнянський І.Д. Взаємодія *Wolbachia pipientis* з мобільними елементами геному дрозофіли: короткий огляд можливих випадків і припущень. DOI: 10.26565/2075-5457-2017-29-4.
30. Shropshire J. D., Leigh B., Bordenstein S. R. Symbiont-mediated cytoplasmic incompatibility: What have we learned in 50 years? *eLife*. 2020. Vol. 9. Article e61989. DOI: 10.7554/eLife.61989 Доступ: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7518888/>
31. Shropshire J. D., Bordenstein S. R. Why *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility is so common. *PLoS Biology*. 2022. Vol. 20(12). DOI: 10.1371/journal.pbio.3001909 Доступ: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36343219/>
32. Lindsey A. R. I. та ін. Reproductive manipulation: *Wolbachia* induce host parthenogenesis using a stolen transformer. *Nature*. 2024. Vol. 631. pp. 45–52. DOI: 10.1038/s41586-024-07832-3 Доступ: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38834030/>
33. Kageyama D. та ін. Feminizing *Wolbachia* endosymbiont disrupts maternal sex chromosome inheritance in a butterfly species. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 2017. Vol. 114(50), pp. 12582–12587. DOI: 10.1073/pnas.1712669114 Доступ: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6121850/>
34. Ma W. J., Vavre F., Beukeboom L. W. Insect Sex Determination Manipulated by Their Endosymbionts: Incidences, Mechanisms and Implications. *Insects*. 2015. Vol. 6(3), pp. 568–599. DOI: 10.3390/insects6030568 Доступ: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4553623/>
35. Werren J. H., Baldo L., Clark M. E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, Vol. 6, pp. 741–751.

36. Teixeira, L., Ferreira, A., and Ashburner, M. (2008). The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol.* 6:e2. doi: 10.1371/journal.pbio.1000002
37. Rottschaefer, S. M., and Lazzaro, B. P. (2012). No effect of *Wolbachia* on resistance to intracellular infection by pathogenic bacteria in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 7:e40500. doi: 10.1371/journal.pone.0040500
38. Martinez, J., Duploux, A., Woolfit, M., Vavre, F., O'Neill, S. L., and Varaldi, J. (2012). Influence of the virus LbFV and of *Wolbachia* in a host-parasitoid interaction. *PLoS ONE* 7:e35081. doi: 10.1371/journal.pone.0035081
39. Landmann, F., Orsi, G. A., Loppin, B., & Sullivan, W. (2009). *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility is associated with impaired histone deposition in the male pronucleus. *PLoS Pathogens*, 5(3), e1000343. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000343>
40. Clark M. E., Veneti Z., Bourtzis K., Karr T. L. Widespread prevalence of *Wolbachia* in laboratory stocks and the implications for *Drosophila* research // *Genetics*. – 2005. – Vol. 170, № 1. – P. 226–238. – DOI: 10.1534/genetics.105.050534.
41. Halligan, Daniel L; Keightley, Peter D (2003). How many lethal alleles?. *Trends in Genetics*. 19 (2): 57–59.
42. Тоцький В. М. Генетика. — Одеса: Астропринт, 2002. — Т. друге видання. — С. 302 — 303.
43. Löhr, U., Chung, H. R., Beller, M., & Jäckle, H. (2010). Bicoid--morphogen function revisited. *Fly*, 4(3), 236–240 А [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/fly.4.3.11862> (дата звернення: 18.03.2024).

44. Wang C, Dickinson LK, Lehmann R. Genetics of nanos localization in *Drosophila*. *Dev Dyn*. 1994 Feb;199(2):103-15.
45. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. *Drosophila and the Molecular Genetics of Pattern Formation: Genesis of the Body Plan*. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26906/> (дата звернення: 18.03.2024).
46. Lappin, T. R., Grier, D. G., Thompson, A., & Halliday, H. L. (2006). HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms. *The Ulster medical journal*, 75(1), 23–31.
47. Ravi Ram, D. Kar Chowdhuri, Chapter 1 - *Drosophila: A Model for Biotechnologists*, Editor(s): Ashish S. Verma, Anchal Singh, Animal Biotechnology, Academic Press, 2014, Pages 3-19.
48. Sambrook J., Russell D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.
49. Паюрковська І. М., Верещагін М. М. *Методи молекулярної біології : навч. посіб.* – Львів : ЛНУ ім. І. Франка, 2014. – 256 с.
50. Атамась П. Р., Єгоров К. Є. *Сучасні методи молекулярної діагностики : навч. посіб.* – Київ : Наукова думка, 2019. – 310 с.
51. Козерецька І.А., Проценко О.В., Жук О.В., Серга С.В. *Генетика дрософіли. Великий практикум* – Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка, 211.
52. Демидов С.В., Білоконь С. В., Алексєєва Т. Г. *Drosophila melanogaster* як тест-система *in vivo* для виявлення генотоксичної дії потенційно-небезпечних препаратів та речовин: методичні вказівки до розділу

великого спеціального практикуму – Одеса : Одес. нац. ун-т імені І. І. Мечникова, 2020. – 32 с.

53. Атраментова, Л. О. та Утєвська, О. М. Статистика : підручник. Харків : Ранок, 2006. 479 с.