

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

**Оцінка титрів ендосимбіотичної бактерії *Wolbachia* у природних
популяціях *Drosophila melanogaster***

(назва роботи)

Спеціальність (спеціалізація) 091 Біологія та біохімія

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

Освітня програма

Генетика
(назва освітньої програми)

Виконавець _____
(підпис)

Данило КОМІСАРЕНКО
(ім'я, прізвище)

Науковий керівник _____
(підпис)

Світлана СЕРГА к.б.н., доц.
(ім'я, прізвище)

Науковий консультант _____
(підпис)

Олександр МАЙСТРЕНКО .PhD.
(ім'я, прізвище)

Харків – 2025

ЗМІСТ

ВСТУП.....	3
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Біологічні особливості <i>Wolbachia pipientis</i>	7
1.2. Симбіотична система <i>Wolbachia–Drosophila</i>	9
1.3. Кількісна оцінка <i>Wolbachia</i> як відображення коеволюції з організмом-хазяїном: поширення, рівні інфікованості та титри	11
1.4. <i>Wolbachia</i> в природних популяціях <i>Drosophila melanogaster</i>	14
1.4.1. Титри бактерії в природі	16
1.4.2. Фактори, які впливають на кількість бактерії в природі.....	17
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	20
2.1. Використані дані	20
2.2. Кількісне визначення <i>Wolbachia</i> у зразках	23
2.3. Географічна варіація кількості <i>Wolbachia</i> в природних популяціях <i>Drosophila melanogaster</i>	24
2.4. Часова та сезонна динаміка кількості <i>Wolbachia</i>	25
2.5. Моделі для оцінки впливу кліматичних факторів.....	27
2.6. Моделі для оцінки впливу грибкових інфекцій	29
РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	32
3.1. Загальний розподіл кількості <i>Wolbachia</i>	32
3.2. Географічна варіація кількості <i>Wolbachia</i> в природних популяціях <i>Drosophila melanogaster</i>	34
3.3. Часова та сезонна динаміка кількості <i>Wolbachia</i>	38
3.4. Вплив кліматичних факторів на кількість <i>Wolbachia</i>	44
3.5. Аналіз лінійних моделей з додаванням грибкових інфекцій, як незалежних змінних що впливають на титр <i>Wolbachia</i>	51
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	60
ВИСНОВКИ	62
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....	63

ВСТУП

Актуальність теми - *Wolbachia pipientis* — один із найпоширеніших ендосимбіонтів членистоногих, здатний інфікувати понад 40–50 % видів [1, 2]. Ця бактерія формує спектр взаємодій із хазяїном — від репродуктивного паразитизму до облігатного мутуалізму — впливаючи на репродуктивні механізми, імунітет і вірусну резистентність [1–3]. *Drosophila melanogaster* є оптимальною моделлю для дослідження кількісних аспектів симбіозу завдяки поєднанню глобального ареалу, широкої представленості *Wolbachia* у природних популяціях, доступності генетичних ресурсів і великої кількості даних секвенування геномів особин з природних популяцій [4, 5]. Кількісна оцінка *Wolbachia* у природних популяціях дає змогу виявити механізми коеволюції симбіонта та організма-хазяїна [4, 5].

Оцінити кількість симбіонта в популяції вида-хазяїна можна за декількома показниками, а саме частотою інфікування та щільністю або титром інфекції. Частота інфікування (infection frequency) є відображає відсоток особин у популяції, які інфіковані *Wolbachia*, і оцінюють її шляхом молекулярного скринінгу особин з природи або ізосамкових ліній [1, 2].

Щільність (density) та титр (titer) *Wolbachia* описують одну біологічну характеристику — кількість бактерій у тілі хазяїна — але відрізняються за методом її вимірювання. Кількість бактерій у конкретній особині визначає силу фенотипових ефектів, таких як цитоплазматична несумісність чи резистентність до вірусів [1, 3, 5]. Під щільністю розуміють кількість бактеріальних клітин у певному об'ємі тканини або органа. Титр *Wolbachia* кількісно оцінює відносну чисельність бактерій як співвідношення копій бактеріального геному до копій геному хазяїна. У геномних дослідженнях титр розраховують через відношення середнього покриття секвенування (mean genome coverage) геному *Wolbachia* до покриття геному хазяїна (або покриття аутосом) в кожному зразку [4, 5].

Кількісне визначення *Wolbachia* у природі потенційно можливе з використанням великого ресурсу DEST2.0 (*Drosophila Evolution over Space and Time* <https://dest-bio2.uab.cat/>), що був створений на основі зразків та пайплайнів генерованих двома консорціумами — DrosEU (<https://droseu.net/>) і Dros-RTEC (<https://elifesciences.org/articles/67577>). Ресурс DEST2.0 включає 737 зразків *D.melanogaster* відсеквенованих методом pooled-seq або індивідуального секвенування з використанням технології Illumina, які походять із різних джерел, зокрема з релізу DEST1.0 (272 зразки, <https://dest.bio/>), з популяційного ресурсу Drosophila Genome Nexus (26 зразків, DGN, <https://www.johnpool.net/genomes.html>), з консорціуму DrosEU (409 зразок) і з DrosRTEC (77 зразків), та інших (37 зразків). Усі 26 зразків з DGN, це індивідуальні секвенси, лабораторних всього 245 зразків, а природних 482 зразки. Секвенування проводили методом Pool-Seq: для кожної популяції формували пул із 30-60 дорослих самців *D. melanogaster*, виділяли тотальну ДНК, готували одну бібліотеку і секвенували її на платформах Illumina (HiSeq / NextSeq) з парно-кінцевими рідками [6, 7]. Потенційно, DEST може дозволити використати геномні дані для кількісного оцінювання *Wolbachia* на основі співвідношення покриття геному бактерії до геному *D. melanogaster* (coverage ratio) (показник, який поєднує рівні інфікованості та титри бактерії у популяціях), у просторі та часі, а також визначити фактори, які можуть впливати на цей показник [7]. Таким, чином DEST є найбільшим масштабним ресурсом, який можна використати для аналізу коєволюції ендосимбіонта та вида-хазяїна у реальному часі.

Мета дослідження: охарактеризувати просторову та часову динаміку кількості ендосимбіотичної бактерії *Wolbachia pipientis* у природних популяціях *D. melanogaster* світу на основі геномних даних ресурсу DEST 2.0, а також оцінити вплив абіотичних та біотичних факторів на рівень ендосимбіонта у популяціях.

Завдання дослідження:

- Оцінити загальний розподіл відносної кількості *Wolbachia* у природних популяціях *Drosophila melanogaster* у світі використовуючи DEST2.0.
- Дослідити варіацію кількості бактерії у популяціях з різних континентів та порівняти з попередніми даними аналізу рівнів інфікування.
- Проаналізувати часову динаміку кількості бактерії в популяціях *D.melanogaster*.
- Оцінити вплив абіотичних (кліматичні) та біотичних факторів (наявність грибів) на кількість *Wolbachia* у природних популяціях *D.melanogaster*.

Об’єкт дослідження – ендосимбіонта бактерія *Wolbachia pipientis* (штам wMel), що інфікує *D. melanogaster*.

Предмет дослідження - просторова та часова динаміка *Wolbachia* у природних популяціях *D. melanogaster*.

Новизна дослідження - У роботі вперше розроблено метод оцінки кількості *Wolbachia* у pooled-seq даних, оскільки раніше цей підхід застосовували лише для аналізу генетичної структури популяцій вида-хазяїна, а кількість симбіонта в об’єднаних зразках ніколи не вимірювали. Також вперше досліджено довготривалу динаміку титру *Wolbachia* у природних популяціях, хоча коеволюційні процеси зміни титру в природі залишаються майже невідомими. Попередні роботи показували вплив кліматичних чинників на частоти інфікування, однак роль біологічних факторів та їхній внесок у варіації титру *Wolbachia* до цього часу не були досліджені. DEST 2.0 містить 737 pooled-seq бібліотек із 12-річним часовим охопленням (2009–2021), що забезпечило можливість провести найбільш масштабний аналіз змін кількості симбіонта безпосередньо у природі.

Теоретична та практична значимість - Розуміння динаміки *Wolbachia* має як теоретичне так і практичне значення. Теоретичне - це відображення

коеволюції симбіонта-організма хазяїна, яку ми не розуміємо. Практичним значенням є скоріший розвиток технології несумісності комах (Incompatible insect technique або ІТ), який спирається на явищі цитоплазматичної несумісності, а саме, ембріональній летальності у схрещуваннях інфікованих самців та неінфікованих самок. Це сприяє зменшенню чисельності популяції комарів у польових умовах. В останні роки ведеться робота над застосуванням методу ІТ для боротьби з іншими переносниками та шкідниками, включаючи шкідника плодових культур *Drosophila suzukii* та *Ceratitis capitata* та найпростішого вектора *C. quinquefasciatus* [1].

Особистий внесок автора - Автор самостійно виконав обробку та статистичний аналіз наявного набору даних, включно з побудовою розподілів титрів, кореляційним аналізом, багатовимірним аналізом (РСА) та побудовою повної моделі залежності титрів від екологічних і біологічних факторів.

Подяки - Автор висловлює глибоку подяку за надані дані та ресурси:

- Європейському Консорціуму Геноміки Популяцій Дрозофіл (The European Drosophila Population Genomics Consortium) та Консорціуму Еволюції Дрозофіл в Реальному Часі (The Drosophila Real-Time Evolution Consortium) за генерацію та відкритий доступ до ресурсу DEST 2.0 (*Drosophila Evolution over Space and Time*, доступний за посиланням <https://dest-bio2.uab.cat/>).
- Доктору Martin Karun (Природознавчий музей Відня та Віденський медичний університет, Австрія) за надання даних покриття геному та титрів.
- Доктору Joaquín Núñez (Доцент біології, Університет Вермонта, США) за надання кліматичних даних.
- Доктору Олександру Майстренку (Університет Амстердама, Нідерланди) за надання даних щодо грибкових інфекцій.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біологічні особливості *Wolbachia pipientis*

Wolbachia pipientis — внутрішньоклітинна α -протеобактерія родини Anaplasmataceae, яка інфікує широкий спектр членистоногих і є одним з найпоширеніших ендосимбіонтів тваринного світу [1, 9, 10]. Вперше описана у 1924 році у комарів роду *Culex*, бактерія довгий час розглядалася переважно як репродуктивний паразит [2, 11]. Сучасні дослідження свідчать, що фенотиповий ефект *Wolbachia* є контекстзалежним і варіює від паразитизму до облігатного мутуалізму [1–3, 8]. Передача *Wolbachia* здійснюється вертикально через жіночу лінію, що обумовлює локалізацію бактерії у клітинах зародкової лінії, особливо в ооцитах [11, 12–14]. Геном бактерії, як і у багатьох облігатних ендосимбіонтів, є редукованим, проте вирізняється великою кількістю мобільних генетичних елементів, про-фагів та рекомбіногенних ділянок [10, 15–17]. Це робить *Wolbachia* генетично пластичною та здатною до швидких еволюційних змін.

Порівняльні філогенетичні дослідження дозволили виокремити два десятка супергруп *Wolbachia* (A–F та інші), які відрізняються спектром хазяїв, біогеографічними особливостями та типом індукованих фенотипів [1, 2, 9]. Найбільш еволюційно успішними є супергрупи A та B, що домінують серед комах. Супергрупи C та D, що характерні для філярій (*Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus*), формують облігатні мутуалістичні взаємовідносини, без яких розвиток нематод неможливий [2, 8, 21]. Супергрупа F виявляє найбільшу еволюційну пластичність і зустрічається як у членистоногих, так і в нематод; її штами можуть викликати як репродуктивні маніпуляції, так і факультативний мутуалізм, покращуючи стресостійкість та пристосованість хазяїна [1, 8, 20]. Супергрупи E, H, I, L є менш чисельними та виявлені у коллембол, павуків та інших членистоногих і зазвичай демонструють слабкі

або контекстуально залежні ефекти, що можуть надавати певні адаптивні переваги [1, 9, 20].

Wolbachia pipientis найчастіше впливає на хазяїна через репродуктивні маніпуляції, які забезпечують ефективне поширення бактерії в популяціях навіть за наявності великої частки неінфікованих особин, причому залежно від штаму та генетики хазяїна вона може набувати ознак облігатного мутуалізму або репродуктивного паразитизму. [1, 2, 11]. Основні прояви цього впливу — цитоплазматична несумісність (cytoplasmic incompatibility - CI, порушення нормального розвитку ембріона в результаті взаємодії між зараженими та незараженими гаметами), фемінізація, індукція партеногенезу та андроцид. При цитоплазматичній несумісності (CI) спостерігається ембріональна смертність у схрещуваннях неінфікованих самок та інфікованих самців, тоді як інфіковані самки здатні «рятувати» розвиток потомства [11, 12–14]. Цей механізм забезпечує еволюційну перевагу інфікованим самкам і сприяє зростанню частоти інфекції у популяції виду-хазяїна. Фемінізація проявляється перетворенням генетичних самців на функціональних самок, а партеногенез — здатністю самок розмножуватись без участі самців. Андроцид (male killing) – форма репродуктивного паразитизму, при якому *Wolbachia* вибірково спричиняє загибель самців, що призводить до зсуву співвідношення статей в сторону самок у вида-хазяїна [1]. Такі стратегії ефективно підвищують репродуктивний успіх хазяїна й підтримують стабільне існування симбіонта.

У низці комах *Wolbachia* може підвищувати життєздатність і стресостійкість особин, що розглядають як факультативний мутуалізм [1–3, 8, 23, 24]. У філярій (*Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus*) взаємодія є облігатною, нормальний розвиток червів без бактерії неможливий, що відповідає стабільному мутуалізму [2, 8, 21]. Окрім репродуктивних фенотипів, зафіксовано підвищення життєздатності та/або плодючості інфікованих ліній, а також підвищення стресостійкості [1–3, 8, 23, 24]. Метаболічні зсуви у

ліпідному та вуглеводному обміні можуть супроводжувати зміни пристосованості [18, 24]. Водночас у деяких комбінаціях «хазяїн–штам *Wolbachia*» описано скорочення тривалості життя та прояви вірулентності [19, 25]. Спрямованість і величина ефектів залежать від штаму та титру *Wolbachia*, генетичного фону хазяїна та умов середовища [5, 26].

1.2. Симбіотична система *Wolbachia*–*Drosophila*

Wolbachia широко інфікує представників роду *Drosophila* і демонструє видо- та штамоспецифічні поєднання «хазяїн–симбіонт». У різних групах дрозофіл, зокрема в комплексі видів *melanogaster* (*D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. mauritiana*, *D. yakuba* та ін.), описано кілька еволюційних ліній *Wolbachia* супергруп А і В, які відрізняються набором індукованих фенотипів і динамікою поширення [1, 2, 18, 20]. Для *D. melanogaster* домінує варіант wMel, тоді як для сиблінгового виду *D. simulans* характерні кілька штамів *Wolbachia* — передусім wRi, але також wHa та wNo, які трапляються в різних популяціях і демонструють виразні репродуктивні фенотипи [1, 4, 5, 15, 18]. У межах комплексу wMel у *D. melanogaster* виділяють кілька груп генотипів (wMel, wMelCS), які відрізняються ступенем вірулентності, впливом на тривалість життя та антивірусним ефектом, а також можуть по-різному модифікувати фекундність хазяїна [1, 18, 22, 24, 29, 31].

Скринінги індивідуальних зразків методом PCR/qPCR та аналізи об'єднаних (пулових) проб, а також in-silico оцінки за WGS/Pool-Seq, показують суттєву географічну варіабельність частот інфікування *Wolbachia* у дрозофіл: від помірних до майже фіксованих значень між континентами й навіть близькими популяціями [4, 5, 15, 26, 28, 29]. Для ряду видів (*D. melanogaster*, *D. simulans*) описано як популяції з частковою інфікованістю, так і майже повну фіксацію інфекції, що відображає баланс між ефективністю вертикальної передачі, силою цитоплазматичної несумісності та впливом бактерії на пристосованість хазяїна (фекандильність у

найпростішому випадку) [2, 5, 14, 18, 20]. Стабільно високі частоти трапляються в системах із сильною цитоплазматичною несумісністю та ефективною вертикальною передачею, тоді як за наявності негативного ефекту на пристосованість частоти нижчі або варіабельні [2, 5, 11, 12, 28, 29]. Узагальнені порівняння з екологічними даними свідчать про відсутність універсальних кліматичних детермінант і водночас можливість сильних регіональних ефектів, коли широта, температура, сезонність та інші чинники впливають на частоти інфекції в окремих регіонах [10, 26, 28, 29]. У різних видів *Drosophila* штами *Wolbachia* демонструють не тільки відмінності в частотах, але й у характері взаємодії з хазяїном. Для *D. simulans* штаму wRi асоціюється з сильною CI та швидким поширенням у природі; для *D. melanogaster* варіанти комплексу wMel можуть поєднувати помірні рівні інфікованості й м'який вплив на фітнес із суттєвим антивірусним захистом [1–3, 18].

Титр *Wolbachia* у популяційних і експериментальних дослідженнях зазвичай оцінюють за допомогою qPCR або цифрової ПЛР як відношення копій бактеріальних маркерів до ядерних маркерів хазяїна, а в геномних підходах — за співвідношенням середнього покриття геномів симбіонта та хазяїна у WGS/Pool-Seq даних [4, 5, 15, 30, 31]. У роботі Early & Clark (2013) показано, що титр *Wolbachia* може суттєво варіювати між географічними популяціями, а також між лініями та тканинами хазяїна; зокрема, для штаму wMel у *D. melanogaster* продемонстровано статистично значущі відмінності рівня титру між п'ятьма природними популяціями [5]. Порівняльні дослідження різних асоціацій «вид–штам» свідчать, що *Wolbachia* підтримує відмінні «типові» рівні титру: у *D. simulans* штаму wRi, як правило, досягає вищих середніх значень і спричиняє сильнішу цитоплазматичну несумісність (CI), тоді як у *D. melanogaster* варіанти комплексу wMel, включно з високовірулентним wMelPop, охоплюють діапазон від помірних рівнів із відносно м'яким впливом на фітнес до надвисоких титрів, пов'язаних з

накопиченням бактерій у тканинах і скороченням тривалості життя [1, 2, 18, 20, 24, 31].

Навіть у межах одного виду рівень титру *Wolbachia* може помітно відрізнятися між генотипами хазяїна та за різних фізіологічних умов, зокрема залежно від віку, статі та стану тканин [5, 15, 21, 25]. Для *Drosophila melanogaster* показано, що титр штаму wMel демонструє статистично значущі відмінності між природними популяціями, а також між лініями, що відображає внесок генетичного фону хазяїна та локальних умов середовища [5]. Серед екологічних чинників, здатних впливати на кількісні показники симбіонта, описано температурні режими, сезонність і пов'язані з ними фізіологічні зміни хазяїна [10, 25, 29]. Рівень титру *Wolbachia* може визначати вираженість фенотипових ефектів симбіозу, зокрема вплив на стресостійкість, метаболічні характеристики та репродуктивну функцію хазяїна [25, 29, 30].

1.3. Кількісна оцінка *Wolbachia* як відображення коеволюції з організмом-хазяїном: поширення, рівні інфікованості та титри

Кількісні параметри симбіозу *Wolbachia*–*Drosophila* — поширення, частота інфікованості та титр — відображають стан коеволюційної взаємодії між ендосимбіонтом і хазяїном. Під поширенням (prevalence) *Wolbachia* розуміють наявність або відсутність інфекції в різних видах та популяціях у просторі й часі, тобто які види *Drosophila* є інфікованими, у яких регіонах та з якими орієнтовними рівнями інфекції [1, 2, 26, 28, 29].

Частота інфекції (infection frequency) є більш індивідуальним параметром і визначає частку особин у конкретній популяції, які несуть *Wolbachia*. Її оцінюють як відношення числа інфікованих особин до загальної кількості протестованих: зазвичай це роблять за допомогою діагностичної PCR або qPCR по маркерах *Wolbachia* (наприклад, *wsp*, *16S rRNA*), іноді —

через скринінг ізосамкових ліній, де наявність інфекції фіксують на рівні лінії [1, 2, 4, 5, 10]. У популяційно-геномних дослідженнях (WGS/Pool-Seq) частоту інфікованості можна реконструювати *in silico*, аналізуючи наявність та кількість секвенованих рідів, що мапують на референсний геном *Wolbachia*; при індивідуальному WGS та секвенуванні ізосамкових ліній інфікованість визначають за виявленням *Wolbachia*-специфічних рідів у кожному геномному зразку і обчислюють частку інфікованих особин у вибірці, тоді як у Pool-Seq оцінка ґрунтується на сукупній частоті рідів *Wolbachia* у пулі ДНК [4, 5, 15, 26, 28, 29].

$$f_{inf} = \frac{N_{inf}}{N_{tot}}$$

де: f_{inf} - частота інфікування *Wolbachia* в популяції;

N_{inf} - кількість інфікованих особин (або ізосамкових ліній);

N_{tot} - загальна кількість протестованих особин (або ліній).

Частота інфекції формується балансом між ефективністю вертикальної передачі, селективними перевагами інфікованих самок (наприклад, за рахунок цитоплазматичної несумісності) і негативними ефектами на пристосованість для хазяїна [2, 11, 12, 20, 26]. Класичну популяційно-генетичну модель поширення *Wolbachia* було формалізовано Тюреллі, який описав зміну частоти інфекції як функцію трьох ключових параметрів: ефективності вертикальної передачі (t), сили цитоплазматичної несумісності (H) та відносної пристосованості інфікованих самок ($1 - s$), де s відображає фітнес-витрати інфекції для хазяїна [12, 20]. За цією моделлю, за умови неповної вертикальної передачі ($t < 1$) та наявності фітнес-витрат ($s > 0$), інфекція може підтримуватися в популяції лише за достатньо сильною цитоплазматичною несумісністю, яка створює селективну перевагу інфікованих самок. Такий баланс параметрів визначає як рівноважну частоту

інфекції, так і можливість її втрати або фіксації в природних популяціях [11, 12, 20].

Титр *Wolbachia* є функціональним маркером інтеграції симбіонта з фізіологією хазяїна. Його оцінюють методом qPCR за відносним рівнем однокопійних маркерних генів *Wolbachia* (*wsp*, *ftsZ*) до ядерних маркерів хазяїна або за співвідношенням секвенувального покриття геномів симбіонта та хазяїна у популяційно-геномних даних (WGS/Pool-Seq) [17, 18, 25]. У геномних дослідженнях титр кількісно визначають як відношення середнього покриття геному *Wolbachia* до середнього покриття геному хазяїна в одному зразку, що дозволяє порівнювати відносну кількість симбіонта між зразками та популяціями. Підвищений титр часто асоціюється з посиленням фенотипових ефектів *Wolbachia*, зокрема з більш вираженим антивірусним захистом, тоді як зв'язок між титром і силою цитоплазматичної несумісності є контекстзалежним та може проявлятися лише за певних поєднань «хазяїн–штам» [1, 6, 28]. Рівень бактеріальної навантаженості формується під впливом генотипу хазяїна, віку, тканинної специфічності та фізіологічного стану, а також середовищних чинників, зокрема температури [17, 30]. У сукупності титр відображає баланс між адаптивними перевагами симбіонта та метаболічними витратами для хазяїна, виступаючи кількісною характеристикою коєволюційної стабільності системи *Wolbachia–Drosophila* [1, 12, 17].

$$T = \frac{C_{Wolb}}{C_{host}}$$

де:

C_{Wolb} - середнє секвенувальне покриття (coverage) геному *Wolbachia*;

C_{host} - середнє покриття геному хазяїна.

1.4. *Wolbachia* в природних популяціях *Drosophila melanogaster*

У природних популяціях *D. melanogaster* інфекція *Wolbachia* широко поширена, але кількісні характеристики симбіонта різняться між регіонами, популяціями та часом збору зразків. Одну з перших міжконтинентальних оцінок інфікованості отримано в роботі Richardson et al. (2012), де на основі повногеномного ресеквенування проаналізовано 290 ізогенних ліній *D. melanogaster* з Північної Америки, Африки та Європи. Наявність *Wolbachia* визначали *in silico* за мапуванням рідів на референсний геном симбіонта, застосовуючи порогові значення для глибини покриття (coverage > 1×) і ширини покриття (> 90 % довжини геному); за цих критеріїв 179 ліній (≈61,8 %) класифіковано як інфіковані [4]. Порівняння з незалежним ПЛР-скринінгом (99 % збігу результатів) показало, що аналіз покриття у WGS є надійним підходом для виявлення інфекції та кількісної характеристики симбіонта на міжконтинентальному рівні [4].

Регіональні дослідження демонструють широкий діапазон частот інфікування *Wolbachia* у природних популяціях *D. melanogaster*, при цьому виявляються виразні, але не універсальні кліматичні та широтні патерни. У роботі Gora et al. 2020 проаналізували 10 популяцій, зібраних у різних регіонах Європи, та поєднали їх із літературними даними для популяцій з інших континентів і кліматичних зон. Всього до аналізу було залучено 280 популяцій (*D. melanogaster*), що представляли 1 086 ізосамкових ліній [27]. Аналіз виконували за допомогою ПЛР зі специфічними праймерами до маркерних генів *Wolbachia*, після чого отримані частоти інфікування співвідносили з кліматичними змінними (середньорічна температура, кількість опадів, показники водного балансу). Показано, що найвищі частоти інфікування спостерігаються за середньорічних температур у діапазоні 20–25 °C, який близький до стандартних лабораторних умов утримання мух, тоді як при відхиленні температури від цього діапазону рівні інфекції, як правило, знижуються. Для євразійських популяцій описано широтний кліматичний градієнт частот

інфікування, а за допомогою моделей логістичної регресії виявили, що варіація частот інфекції краще пояснюється градієнтами температури та показниками водного балансу (зокрема евапотранспірацією), ніж простим поділом популяцій за континентами [27]. У Kriesner et al. 2016 аналізували довготривалу динаміку широтного клайну частот інфікування *Wolbachia* у природних популяціях *D. melanogaster* вздовж східного узбережжя Австралії. Вибірки з ряду локалітетів від тропічних до прохолодних помірних широт порівнювали з історичними даними, що показало збереження кліну щонайменше протягом ~20 років. Частоти інфекції стабільно високі в тропічних популяціях і суттєво нижчі в прохолодних помірних регіонах. Виявляли інфекцію стандартним методом ПЛР або ПЛР у реальному часі / високороздільного розплаву (Real-Time PCR / High-Resolution Melting). Додатково автори показали, що подібний клайн менш виражений у східній Північній Америці, а обмежені вибірки з Африки на відповідних широтах здебільшого мають високі частоти, за винятком окремих екваторіальних популяцій із нижчою інфікованістю. [28]. Таким чином, незалежні дані для Євразії та Австралії узгоджено показують, що важливу роль у формуванні частот інфікування *Wolbachia* мають температурні і широтні градієнти, але конкретний профіль кліну є регіонально специфічним.

Окремим аспектом динаміки *Wolbachia* в *D. melanogaster* є еволюція внутрішньовидових варіантів штаму wMel. Сучасні дані свідчать, що в переважній більшості природних популяцій цього виду циркулює одна лінія *Wolbachia* супергрупи A — wMel, однак у її межах на основі геномних та структурних відмінностей виділяють декілька близькоспоріднених генотипів. Найкраще описаними серед них є wMel-подібні та wMelCS-подібні варіанти, тоді як інші внутрішні варіанти розглядають як похідні або проміжні форми цих двох основних груп [4, 32, 33]. Тому в більшості робіт саме порівняння wMel і wMelCS використовується для опису внутрішньолінійної мінливості *Wolbachia* у *D. melanogaster*.

Порівняльний аналіз історичних лабораторних ліній, музейних зразків та сучасних природних популяцій *D. melanogaster* показав, що в першій половині XX століття у європейських і деяких інших популяціях частіше траплялися wMelCS-подібні генотипи *Wolbachia*, тоді як у сучасних вибірках з більшості регіонів світу майже повсюдно домінують wMel-подібні варіанти, а wMelCS зберігається на низьких частотах або не виявляється [32, 33]. Філогенетичні реконструкції, засновані на повногеномних даних *Wolbachia* та мітохондріальної ДНК хазяїна, свідчать, що всі сучасні wMel-інфекції походять від спільного цитоплазматичного предка, який існував приблизно 1–3 тисячі років тому (за оцінками Richardson et al. 2012) [4]. Водночас аналіз датованих музейних та лабораторних зразків демонструє істотні зміни у співвідношенні внутрішньолінійних генотипів wMel протягом XX століття, що інтерпретується як глобальне зміщення частот на користь wMel-подібних варіантів без повного витіснення альтернативних генотипів [32, 33].

1.4.1. Титри бактерії в природі

Наявні до цього часу уявлення про титри *Wolbachia* в природних популяціях комах, зокрема *Drosophila melanogaster*, базуються на обмеженій кількості робіт і мають фрагментарний характер. Більшість досліджень зосереджувалися на лабораторних лініях або на порівнянні різних асоціацій «хазяїн–штам», тоді як систематичні оцінки рівня бактеріального навантаження в природних популяціях залишалися поодинокими [1, 4, 5].

Для *D. melanogaster* показано, що інфекція *Wolbachia* зазвичай підтримується на помірному рівні відносної чисельності бактерії, який забезпечує ефективну материнську передачу та прояв окремих фенотипових ефектів без вираженої шкоди для життєздатності хазяїна [1, 2, 24]. Зокрема, у більшості природних і лабораторних ліній, інфікованих штамом wMel, не спостерігають екстремально високих рівнів бактеріального навантаження, на

відміну від високовірулентних варіантів, таких як wMelPop, для яких характерне значне накопичення бактерії в тканинах і скорочення тривалості життя хазяїна [24, 31].

Ранні уявлення про кількісні характеристики інфекції *Wolbachia* у *Drosophila melanogaster* формувалися переважно на основі порівнянь окремих лабораторних ліній або міжвидових асоціацій і вказували на існування відносно стабілізованих, «типових» рівнів бактеріального навантаження для конкретних пар «хазяїн–штам» [1, 2, 18, 20]. У межах *D. melanogaster* інфекція, зумовлена штамом wMel, зазвичай описувалася як така, що підтримується на помірному рівні чисельності й не супроводжується різко вираженою вірулентністю, що сприяло уявленню про відносну сталість титру в природі. Водночас ці висновки ґрунтувалися на обмежених вибірках і не дозволяли оцінити масштаб мінливості титру між природними популяціями. Таким чином, до початку масштабних популяційно-геномних досліджень знання про титри *Wolbachia* в природних популяціях *D. melanogaster* обмежувалися поодинокими прикладами та не забезпечували узгодженої кількісної картини їхньої просторової мінливості.

1.4.2. Фактори, які впливають на кількість бактерії в природі

У природних популяціях *Drosophila melanogaster* кількість *Wolbachia* (як на рівні частоти інфікування, так і на рівні титру в межах інфікованих особин) формується поєднанням генетичних, кліматичних та демографічних чинників. Наявні популяційні та геномні дослідження свідчать, що варіація титру не є випадковою, а відображає взаємодію генотипу хазяїна й симбіонта з умовами середовища, навіть за відносно стабільної вертикальної передачі інфекції [10, 25, 29].

Популяційно-геномні дослідження *D. melanogaster* показали, що інфекція *Wolbachia* (wMel) тісно асоційована з певними поєднаннями

мітохондріального та ядерного геномів хазяїна, а також демонструє стійкі міжпопуляційні відмінності у представленості цитоплазматичних ліній [4, 27, 32]. Така структура інфекції в природі узгоджується з припущенням, що кількісні характеристики симбіонта, зокрема рівень бактеріального навантаження в інфікованих особинах, формуються в генетичному контексті хазяїна і потенційно можуть відрізнятися між популяціями. Дослідження коеволюції мтДНК і *Wolbachia* показало, що різні цитоплазматичні лінії (*wMel*, *wMelCS* та їх варіанти) стабільно асоційовані з певними гаплогрупами мітохондріального геному, що вказує на генетично зумовлені комплекси «мтДНК–штам *Wolbachia*» з кількісними характеристиками інфекції, які опосередковані генетичним фоном хазяїна [4, 5]. У природних популяціях *Drosophila melanogaster* кількість *Wolbachia* на популяційному рівні також визначається демографічною динамікою цитоплазматичних ліній, зокрема частотою поширення різних варіантів *wMel*. Показано, що генотипи *Wolbachia* з меншими витратами для фітнесу хазяїна мають вищу ефективність підтримання в популяціях і з часом витісняють альтернативні варіанти, що проявляється у зміні середнього бактеріального навантаження на рівні популяції без необхідності змін у механізмах передачі [29, 32, 33]. Польові дані з українських та європейських популяцій свідчать, що генотипи *Wolbachia* з меншим негативним впливом на фітнес хазяїна (зокрема *wMel* порівняно з *wMelCS*) досягають вищих частот у природних популяціях і, таким чином, визначають загальний кількісний внесок симбіонта у популяційний пул інфікованих особин [29, 32, 33]. Таким чином, поєднання ядерного та мітохондріального генотипів хазяїна з типом інфекції *Wolbachia* формує базовий рівень бактеріального навантаження в природних популяціях *D. melanogaster*.

Кліматичні умови розглядають як важливий зовнішній чинник, що впливає на кількісні параметри асоціації *Wolbachia*–хазяїн у природі, зокрема через їхній вплив на фізіологічний стан, репродуктивну активність та енергетичний баланс *Drosophila melanogaster* [26–28]. Хоча більшість

наявних досліджень зосереджена на аналізі частот інфікування, узагальнені порівняльні дані свідчать, що температура, сезонність і пов'язані з ними стресові умови можуть задавати межі, в яких підтримується певний рівень бактеріального навантаження. Такі чинники описують як модулюючі — вони не визначають безпосередньо наявність інфекції, але здатні зміщувати баланс між реплікацією *Wolbachia* та фізіологічними обмеженнями хазяїна, що потенційно відображається на кількісних характеристиках симбіонта [26–28]. Експерименти з довготривалою термальною адаптацією лабораторних популяцій природного походження продемонстрували, що різні температурні режими призводять до стійких зрушень у співвідношенні штамів *Wolbachia* і рівнях їхнього бактеріального навантаження [34]. Експериментальні дані для природних ліній *D. melanogaster* показують, що реакція титру *Wolbachia* на температуру залежить як від типу інфекції, так і від генотипу хазяїна: лінії з *wMel* та *wMelCS* демонструють різні зміни бактеріального навантаження при зміні температури інкубації, а окремі генотипи мають протилежні температурні реакції за однакових умов [37]. Узагальнюючі огляди свідчать, що кліматичні чинники, зокрема температура та тепловий стрес, є важливими, але не єдиними детермінантами кількісних показників *Wolbachia*; їхній вплив реалізується у взаємодії з біологічними характеристиками системи, включно з віком і фізіологічним станом хазяїна, тканинною локалізацією симбіонта, генотипом *Drosophila melanogaster*, типом інфікуючого штаму *Wolbachia*, ефективністю вертикальної передачі, станом імунної системи та метаболічним контекстом хазяїна [26, 38].

Кількість бактеріальних клітин *Wolbachia* в організмі *Drosophila melanogaster* є динамічною величиною на рівні окремої особини і змінюється залежно від стадії розвитку, статі та тканинної локалізації симбіонта [1, 31, 38]. Дані транскриптомного аналізу протягом життєвого циклу показують, що, попри загальну стабільність експресії більшості бактеріальних генів, окремі функціональні групи (зокрема гени мембранних білків, систем секреції та білки з анкіриновими повторами) демонструють стадійно- та

статеву-специфічну регуляцію, що узгоджується з перерозподілом бактеріальної маси між тканинами хазяїна [31].

Особливе значення для кількісної динаміки має локалізація *Wolbachia* у зародковій лінії. Цитологічні дослідження оогенезу *D. melanogaster* показали, що внутрішньоклітинний транспорт і конкуренція за доступ до заднього полюса ооцита визначають щільність симбіонта в гонадах та ефективність його материнської передачі, безпосередньо впливаючи на кількість бактерії в наступному поколінні [13, 14].

На рівні природних популяцій ці інтраіндивідуальні процеси мають демографічні наслідки. Зокрема, для українських популяцій показано, що інфекція wMelCS асоціюється зі зниженням плодючості порівняно з wMel за подібної ефективності вертикальної передачі, що свідчить про відмінності у витратах для хазяїна при різних рівнях бактеріального навантаження [29]. Крім того, оглядові дані вказують, що імунний та метаболічний стан хазяїна, зокрема за умов додаткових стресів, може додатково модулювати кількість *Wolbachia* в організмі, підкреслюючи багаторівневу природу регуляції симбіонта [23, 24, 38].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Використані дані

В роботі використані геномні дані з ресурсу DEST 2.0 (*Drosophila* Evolution over Space and Time <https://dest-bio2.uab.cat/>), що є найбільшою укомплектованою базою даних геномів *D.melanogaster* та містить 737 зразків: 272 першого релізу DEST1.0 (<https://dest.bio/>), 26 з популяційного ресурсу *Drosophila* Genome Nexus (DGN, <https://www.johnpool.net/genomes.html>), з консорціуму DrosEU (409 зразків,

<https://droseu.net/>) і з DrosRTEC (77 зразків, <https://elifesciences.org/articles/67577>), та 37 зразків з інших джерел. Усі 26 зразків з DGN, це індивідуальні сиквенси, лабораторних всього 245 зразків, а природних 482 зразки. Для кожної популяції формували пул із 30-60 дорослих особин *D. melanogaster*, виділяли сумарну ДНК, готували одну бібліотеку і секвенували її на платформах Illumina (HiSeq / NextSeq) з парно-кінцевими рідками. У сукупності база дає уявлення про генетичне різноманіття *D. melanogaster* у 47 країнах на 6 континентах (Африка, Азія, Європа, Північна Америка, Південна Америка, Австралія) з інтервалом спостережень 2009–2021 років (12 років). В роботі були використані метадані з публікації Núñez et al. 2025 для опису та фільтрування зразків [7].

Також були використані дані відносних титрів *Wolbachia* для зразків DEST, отримані доктором Martin Karun (n = 687). Для їх отримання сирі секвенувальні дані у форматі FASTQ (файли, що містять послідовності рідів разом із значеннями їхньої якості) вирівнювали на комбінований референсний геном, який включав: референсний геном *D. melanogaster* v6 (шоста збірка геному, Hoskins et al. 2015), та референсний геном *Wolbachia* штаму wMel [41]. Вирівнювання виконували двома інструментами: bwa mem — алгоритм для картування коротких парно-кінцевих Illumina-рідів.

Після отримання BAM-файлів глибину покриття (read depth, RD) обчислювали за допомогою команди samtools coverage у поєднанні із індивідуально побудованим Python-скриптом SumReadDepths.py, підраховуючи середній RD (read depth) окремо для геному *Wolbachia* та для всіх аутосом *D. melanogaster*. Відносний титр визначали як відношення середнього RD *Wolbachia* до середнього RD аутосом хазяїна, що забезпечує оцінку кількості бактеріальної ДНК відносно кількості ДНК хазяїна. Додатково враховували частку геному *Wolbachia*, до якої вирівняні секвеновані ріди, та абсолютний RD, що дозволило класифікувати зразки як інфіковані, неінфіковані або з невизначеним статусом за критеріями,

описаними в Scholz et al. 2023 та Kapun et al. 2020. У подальшому аналізі використані саме ці значення відносного титру *Wolbachia* для 687 DEST-зразків як кількісну змінну Titer [43, 44].

Для частини зразків DEST 2.0, які мали точні дати збору (jday) та пройшли всі критерії якості (“pass filter”), були надані додаткові кліматичні дані: середні значення температури, відносної вологості та кількості опадів, обчислені для інтервалу 30 днів до дати збору кожної популяції. Ці дані були отримані з кліматичної платформи NASA Power (NASA Prediction Of Worldwide Energy Resources), що містить глобальні щоденні метеопказники, доступні за координатами та датами.

Обчислення кліматичних характеристик було виконано дослідницькою групою доктора Joaquín Núñez: дані NASA Power були завантажені, очищені, агреговані й структуровані у вигляді R-об’єкта, який містить середньорічну температуру повітря, стандартне відхилення температури, середньорічну відносну вологість повітря, стандартне відхилення відносної вологості, середньорічну суму опадів і стандартне відхилення сумарних опадів для 524 зразків DEST 2.0. Обробка даних була здійснена з використанням обчислювальної інфраструктури Vermont Advanced Computing Center, а формування фінального датасету виконали Joaquín Núñez та його студент Miles Garvin.

І дані по грибковим інфекціям, що включають 402 зразків *D. melanogaster* і 86 видів грибів, надані Олександром Майстренком. Детекція грибів проводилась за допомогою програми metaEukaryome https://pypi.org/project/meta_eukaryome_detect/. Кожний вид грибів вважався присутнім якщо принаймні 5% мітохондріального геному мала глибину покриття 1x [45].

2.2. Кількісне визначення *Wolbachia* у зразках

Аналіз загального розподілу титру був виконаний за допомогою мови програмування R із використанням програми RStudio — зручного графічного інтерфейсу, що забезпечує ефективну роботу з мовою R та інструментами для обробки даних і побудови графіків. (<https://posit.co/products/open-source/rstudio/?sid=1>) [39].

В програму був завантажений файл Supplementary_tables (753 зразки) з даними DEST 2.0 у вигляді таблиці формату xlsx (Microsoft Excel), файл WolbDest (687 зразків) з даними вирахованих титрів у текстовому форматі txt, файл weather_1mo_prior (524 зразки) з кліматичними даними зразків у форматі збереженого об'єкту RStudio (Rdata) і файл concat_Mitochondria_DrosEu_v1_partialSamples (402 зразки і 86 видів грибів) з даними по грибковим інфекціям в зразках у форматі таблиці tab (старий формат Microsoft Excel). Далі файли Supplementary_tables, WolbDest і weather_1mo_prior були комбіновані в єдину базу (md), після чого дані були відфільтровані для виділення зразків, що були пул-секвеновані і зібрані в диких умовах, та видалення зразків які не мали значення титру і не мали даних про континент збору.

В даних з таблиці Supplementary_tables окремо наводиться оцінка контамінації *D. simulans*, оскільки *D. melanogaster* і *D. simulans* є сиблінговими видами та нерідко присутні в одних і тих самих природніх популяціях, що може призводити до випадкового включення особин *D. simulans* у пул-секвенування *D. melanogaster*. Рівень такої контамінації оцінювався двома незалежними методами: конкурентним мапуванням рідів до референсних геномів *D. melanogaster* та *D. simulans*, і k-mer аналізом, який дозволяє вимірювати пропорцію видоспецифічних k-mer-послідовностей у початкових даних секвенування. Обидва методи були перевірені за допомогою *in silico* сумішей двох видів, що підтвердило їх точність у визначенні частки *D. simulans* у пулі. Оскільки наявність іншого виду у

вибірці може суттєво спотворювати оцінку титру *Wolbachia* та генетичні параметри, для аналізу були відфільтровані усі зразки з рівнем контамінації *D. simulans* ≥ 0.5 , залишивши лише ті, де показник був < 0.5 , що відповідає рекомендаціям і логіці якісного контролю даних DEST. Після застосування фільтрів в комбінованій базі даних (md) залишилось 429 зразків.

Для аналізу загального розподілу кількості бактерії *Wolbachia* у *D. melanogaster* були побудовані дві гістограми, перша включає в себе усі зразки з бази (md), включаючи зразки в яких відсутні ріди, які мапуються на геном бактерії (WolbCov = 0), друга, побудована на основі бази даних (md), до якої був застосований фільтр для видалення зразків без *Wolbachia*.

2.3. Географічна варіація кількості *Wolbachia* в природних популяціях *Drosophila melanogaster*

Для оцінки відмінностей титру *Wolbachia* між популяціями, зібраними на різних континентах, було проведено статистичний аналіз, що включав кілька послідовних етапів. За допомогою тесту Шапіро–Вілка була перевірена нормальність розподілу даних, в результаті виявилось істотне відхилення розподілу від нормальності, що робить неможливим застосування параметричних методів. Наступним етапом, була оцінка різниці медіан серед незалежних вибірок за допомогою непараметричного критерія Краскела–Уолліса [40]. Оскільки глобальний тест виявив статистично значущі відмінності, було виконано попарні порівняння за допомогою тесту Dunn post-hoc з поправкою Бонферроні, що дозволяє коректно врахувати множинні порівняння та надійно визначити, які саме континентальні пари дійсно відрізняються між собою. Для кожної пари порівнянь були отримані скориговані р-значення (p.adj), а рівні значущості впорядковані та інтерпретовані відповідно до стандартних порогів ($p \leq 0.001$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.05$, ns - незначущі відмінності). Додатково оцінено кореляційні зв'язки

окремо між титром і широтою, та титром і довготою локалізації, в якій проводився збір.

На основі отриманих результатів була створена графічна візуалізація у вигляді скрипкової діаграми (violin plot), які відображають розподіл титру в межах кожного континенту та підсилюють висновки, отримані статистичними тестами.

2.4. Часова та сезонна динаміка кількості *Wolbachia*

Для оцінки загальної часової динаміки кількості *Wolbachia* спочатку перевіряли нормальність розподілу значень титру за допомогою критерію Шапіро–Вілка. Оскільки розподіл істотно відхилявся від нормального, для аналізу зв'язку з часом використано коефіцієнт рангової кореляції Спірмана (Spearman, C. 1904) між титром і порядковим днем року збору зразка (jday). Отримані значення ρ та p -рівня використовувалися для кількісної оцінки наявності або відсутності стійкого спрямованого зміщення титру протягом сезону, а результати додатково було візуалізовано на кореляційному графіку[44].

Для оцінки часової динаміки титру в межах окремих регіонів усю вибірку (база даних md) додатково розділили на континентальні підгрупи (Європа - md_E, Північна Америка - md_N, Азія - md_A, Африка - md_Africa). Для кожного континенту формували окремий набір даних і обчислювали коефіцієнт рангової кореляції Спірмана із p -значенням між кількістю бактерій і порядковим днем збору (jday). Результати кореляційного аналізу візуалізували на діаграмі розсіювання з jday по осі X та Titer по осі Y.

Для оцінки сезонної динаміки титру всі зразки було згруповано за сезонами (Autumn, Spring, Summer, Winter): порядковий день року (jday) дати збору конвертували спочатку у місяць, а потім у сезон. На основі цих

категорій було отримано розподіл значень титру за сезонами, а також обчислені медіанні значення титру окремо для кожного сезону.

Для перевірки можливих сезонних відмінностей було здійснено спробу застосування непараметричного критерію Краскела–Уолліса. Також було застосовано попарне порівняння сезонів за допомогою Dunn post-hoc тесту з поправкою за Бонферроні. Далі сезонну динаміку аналізували окремо для кожного континенту (підмножини md_E, md_N, md_A, md_Africa). Для кожної підмножини повторно обчислювали сезонний розподіл титру та відповідні медіанні значення для кожного сезону. Статистичні тести між сезонами на континентальному рівні не проводилися через невеликі вибірки та асиметричний розподіл даних. Графічно візуалізували аналіз у вигляді діаграм розмаху (boxplot), окремо для загального розподілу, та окремо для кожного континенту.

Для оцінки змін титру *Wolbachia* у часі в межах окремих природних популяцій з бази даних (md) було виділено підмножину зразків, що походять з одних і тих самих географічних локацій, але були зібрані у різні дати. Вибірку фільтрували за кількістю повторних відборів: до аналізу включали лише ті локальні серії, що містили понад три спостереження, що дозволяє формувати інформативні часові ряди. Після фільтрації отримано 311 зразків. Часова динаміка оцінювалася за зміною титру відносно календарної дати у кожній локації, що дозволило порівняти патерни варіації титру між популяціями та виявити потенційні тренди або локальні особливості. Для візуалізації результатів були побудовані загальний графік часової динаміки, і фасетований графік, на якому кожна локація зображена окремо.

2.5. Моделі для оцінки впливу кліматичних факторів на титр *Wolbachia*

Для аналізу впливу абіотичних факторів на титр *Wolbachia* до основної бази даних було додано кліматичні показники для локалітетів збору зразків. До аналізу включили шість кліматичних змінних: середню температуру повітря, середню відносну вологість, скориговану сумарну кількість опадів, а також показники мінливості температури, вологості та опадів.

На першому етапі було побудовано кореляційну матрицю та heatmap для оцінки взаємозв'язків між кліматичними змінними та виявлення мультиколінеарності. Оскільки кліматичні показники виявилися сильно скорельованими між собою, для зменшення розмірності даних і виділення незалежних екологічних градієнтів було проведено аналіз головних компонентів (principal component analysis, PCA). PCA дозволив узагальнити інформацію з кількох кліматичних змінних у невелику кількість незалежних компонент, придатних для включення в лінійні моделі без порушення їх статистичних припущень.

Аналіз PCA виконували в середовищі **R** з використанням пакета **stats**, а візуалізацію навантажень змінних і головних компонент (PCA biplot) здійснювали за допомогою пакета **factoextra**. До подальшого моделювання було відібрано перші три головні компоненти (PC1–PC3), які разом пояснювали більшу частину загальної кліматичної варіації.

Для оцінки факторів, що визначають варіабельність титру *Wolbachia*, було побудовано серію лінійних моделей із поступовим додаванням незалежних змінних (predictors). Залежною змінною (response, *y*) у всіх моделях був титр *Wolbachia* (Titer) (Таблиця 1)

Таким чином, моделі послідовно враховували технічні параметри секвенування (Cov, SimCont.Norm), географічні координати, сезон збору та узагальнені кліматичні градієнти, отримані за допомогою PCA. Для кожної

моделі обчислювали інформаційний критерій Акаїке (AIC). Найкращою вважали модель з мінімальним AIC, а моделі з $\Delta AIC \leq 2$ розглядали як статистично конкурентні.

Таблиця 1 Параметри лінійних моделей для оцінки впливу кліматичних факторів на титр *Wolbachia*

№ моделі	Параметри моделі	Опис незалежних змінних
model_0	$Titer \sim 1$	Нульова модель (лише константа)
model_1	$Titer \sim Cov$	Додається технічний параметр секвенування (покриття геному дрозофіли)
model_2	$Titer \sim Cov + SimCont.Norm$	Технічні параметри секвенування
model_3	$Titer \sim Cov + SimCont.Norm + lat$	Технічні параметри + широта
model_4	$Titer \sim Cov + SimCont.Norm + lat + long$	Технічні параметри + географічні координати
model_5	$Titer \sim Cov + SimCont.Norm + lat + long + real_season$	Технічні параметри + географія + сезон збору

model_6	$Titer \sim Cov + SimCont.Norm + lat + long + real_season + PC1$	Додавання першої головної кліматичної компоненти
model_7	$Titer \sim Cov + SimCont.Norm + lat + long + real_season + PC1 + PC2$	Додавання другої головної кліматичної компоненти
model_8	$Titer \sim Cov + SimCont.Norm + lat + long + real_season + PC1 + PC2 + PC3$	Повна модель, яка включає всі технічні, географічні, часові та кліматична модель

2.6. Моделі для оцінки впливу грибкових інфекцій на титр *Wolbachia*

Для аналізу потенційного впливу біотичних факторів було сформовано бінарну матрицю грибкових інфекцій, що відображала наявність або відсутність окремих таксонів грибів у кожному зразку. Рядки матриці відповідали індивідуальним зразкам *Drosophila melanogaster*, а стовпчики — окремим видам або родам грибів; значенням «1» позначали наявність, а «0» — відсутність грибкової інфекції. Бінаризацію проводили на основі частки геномного покриття грибкового референсу в метагеномних даних зразка (*breadthFraction*): значення *breadthFraction* > 0.01 інтерпретували як наявність гриба, < 0.01 — як його відсутність. До подальшого аналізу включали лише ті грибкові таксони, що траплялися щонайменше у 10 популяційних зразках *D. melanogaster*.

До аналізу включали лише ті грибкові таксони, що траплялися щонайменше у 10 зразках, щоб уникнути нестабільних оцінок, пов'язаних із

рідкісними спостереженнями. Дані з бінарної грибкової матриці були інтегровані з основним датафреймом, який містив титр *Wolbachia* та набір базових незалежних змінних (Cov, SimCont.Norm, lat, long, real_season, PC1–PC3).

На відміну від кліматичних моделей, грибкові змінні додавалися до моделей групами. Це було пов'язано з великою кількістю потенційних біологічних предикторів і необхідністю контролю складності моделей. Кожна модель включала базовий набір незалежних змінних та одну групу з 5 грибових таксонів, закодованих бінарно. Лінійні моделі для грибових факторів будували у вигляді (Таблиця 2):

$$\text{Titer} \sim \text{Cov} + \text{SimCont.Norm} + \text{lat} + \text{long} + \text{real_season} + \text{PC1} + \text{PC2} (+ \text{group of fungal predictors})$$

Для кожної моделі обчислювали значення AIC, після чого формували зведену таблицю з AIC, ΔAIC та інформацією про грибові таксони, включені до моделі. Додатково оцінювали статистичну значущість окремих грибових предикторів ($p < 0.05$). Порівняння AIC між моделями дозволяло визначити, чи покращує включення грибових асоціацій пояснення варіації титру *Wolbachia* порівняно з моделями, що враховували лише кліматичні та географічні фактори.

Таблиця 2 Структура лінійних моделей для оцінки впливу грибових інфекцій на титр *Wolbachia*

№ моделі	Формула моделі	Грибкові предиктори (presence/absence)
Fmodel_1	<i>Titer</i> ~ база + гриби	<i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Metschnikowia reukaufii</i> , <i>Pichia kluyveri</i> , <i>Saccharomyces arboricola</i> , <i>Saccharomyces cariocanus</i> , <i>Saccharomyces paradoxus</i>
Fmodel_2	<i>Titer</i> ~ база + гриби	<i>Starmerella bacillaris</i> , <i>Sydowia polyspora</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Penicillium digitatum</i>
Fmodel_3	<i>Titer</i> ~ база + гриби	<i>Penicillium solitum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. polonicum</i> , <i>P. nordicum</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>Zygosaccharomyces parabailii</i> , <i>Aspergillus tubingensis</i> , <i>A. luchuensis</i> , <i>A. niger</i>
Fmodel_4	<i>Titer</i> ~ база + гриби	<i>Candida orthopsilosis</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Meyerozyma guilliermondii</i> , <i>Saccharomyces paradoxus</i> , <i>Wickerhamomyces pijperi</i>
Fmodel_5	<i>Titer</i> ~ база + гриби	<i>Monilinia laxa</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Magnusiomyces magnusii</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i>

Всі операції виконані за допомогою наступних бібліотек (модулів, що містять функції, дані та документацію, які розширюють базові можливості мови): readr, patchwork, dplyr, scales, rstatix, ggpubr, lubridate, stringr, ggplot2, openxlsx, tidyr, viridis, corrplot, psych, Hmisc, PerformanceAnalytics, factoextra, ggfortify, purrr.

РОЗДІЛ 3

АНАЛІЗ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

3.1. Загальний розподіл кількості *Wolbachia*

Загальний розподіл титрів *Wolbachia* демонструє розмах від найнижчого значення - 0 до 4.78, та різко правосторонню асиметрію (left-skewed distribution), що свідчить про переважання низьких значень титру серед проаналізованих природних популяцій *D. melanogaster*. 36 зразків (8.6%) мають нульове значення титру, що означає відсутність бактерії у популяціях.

На першому графіку, який включає всі значення, видно, що значна частина вибірки має титр у діапазоні 0–0.5, тоді як значення вище 1.0 трапляються поступово рідше. Велика кількість дуже малих титрів формує виражену концентрацію нульових значень та поступове зменшення частоти зі збільшенням титру (Рис. 1 а, б). Обчислений таким чином титр включає як кількість інфікованих особин, так і кількість бактерій у середині кожної мухи у зразку. Значення титру нижче одиниці є цілком очікуваним у даних pool-seq, оскільки рівні інфікованості не є 100% у популяціях *D.melanogaster* та кількість рідій дрозофіл буде переважати, кількість рідів *Wolbachia*.

Форма розподілу титрів підтверджує чітке відхилення від нормальності, що узгоджується з тестом Шапіро–Вілка та виправдовує застосування непараметричних підходів. Результати свідчать, що для більшості природних популяцій характерні низькі та помірні рівні титру *Wolbachia*, тоді як високі значення є рідкісними та можуть бути пов'язані з унікальними екологічними або генотиповими особливостями окремих зразків.

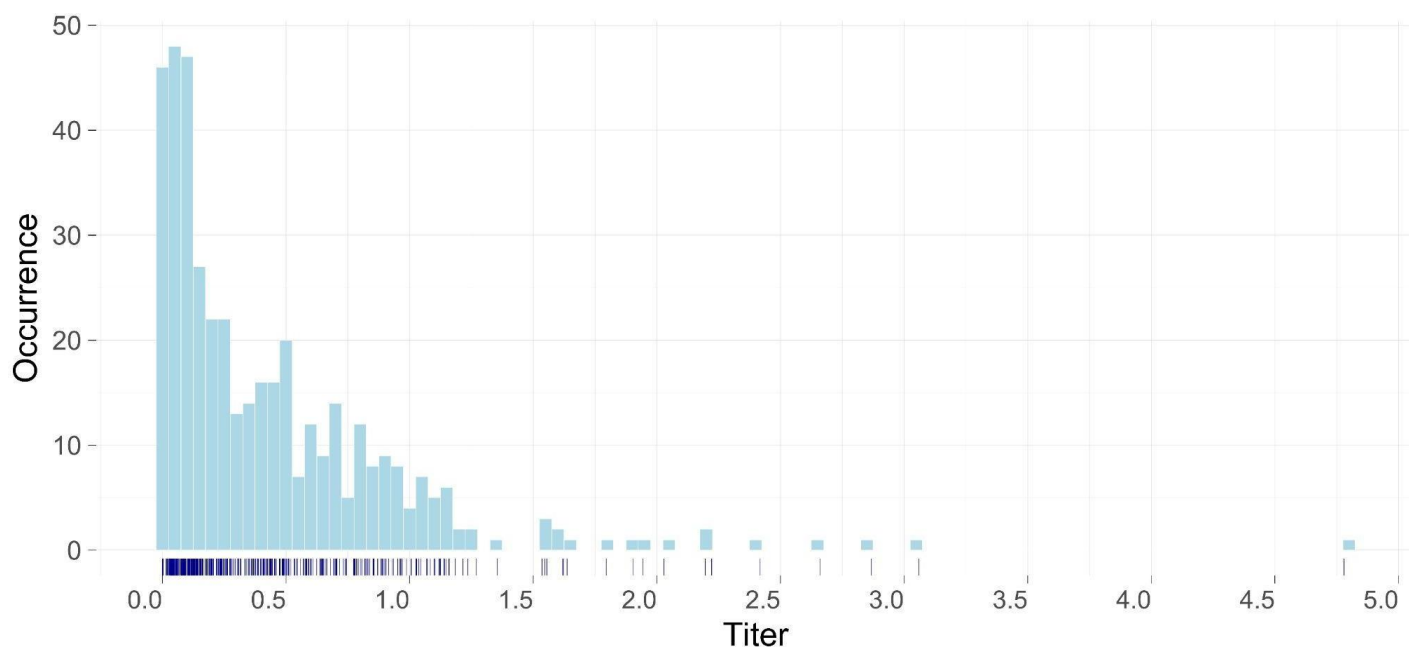


Рис. 1 а Загальний розподіл титрів *Wolbachia*. Вісь X - титр *Wolbachia*, вісь Y — кількість зразків у відповідних інтервалах значень.

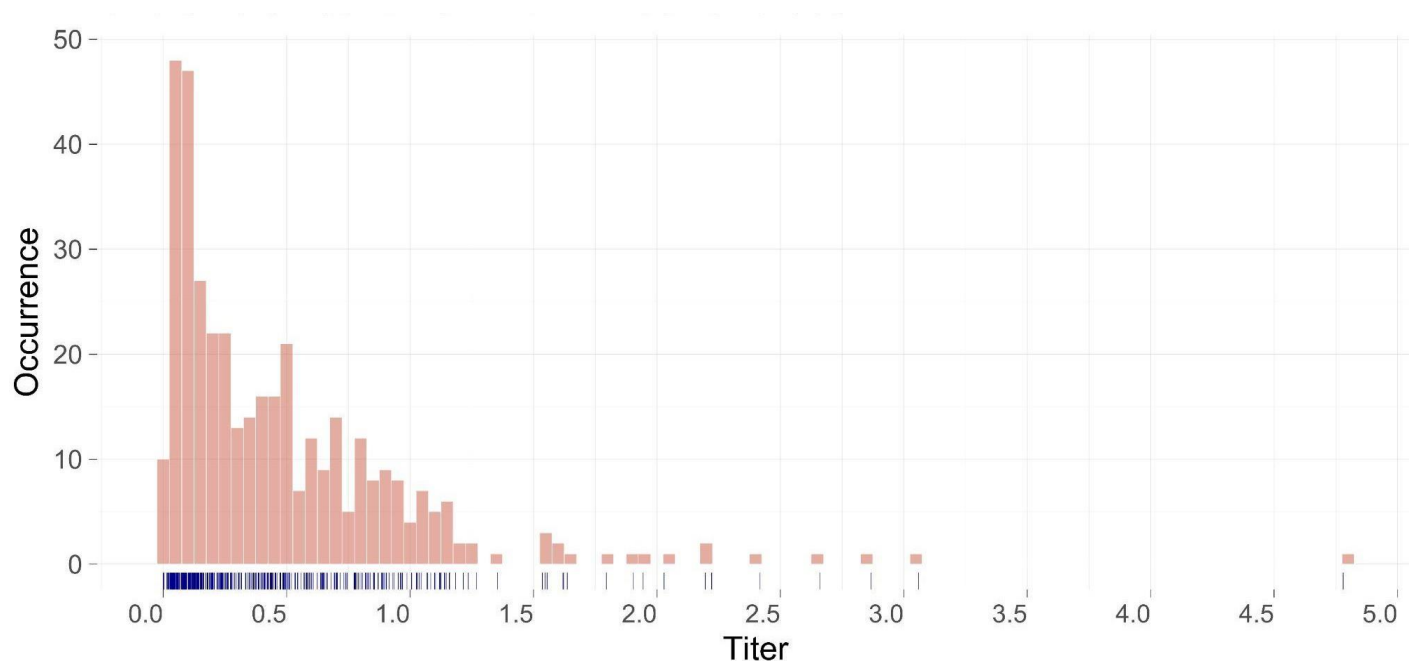


Рис. 1 б Загальний розподіл титрів *Wolbachia* без зразків з нульовим значенням титру.

3.2. Географічна варіація кількості *Wolbachia* в природних популяціях *Drosophila melanogaster*

Усього було проаналізовано 419 зразків *D. melanogaster* із чотирьох континентів: Африки ($n = 7$), Азії ($n = 33$), Європи ($n = 310$) та Північної Америки ($n = 69$). Розподіл кількості *Wolbachia* демонструє значну асиметричність і широкий діапазон варіації — для Африки 0.042-0.386, для Азії 0.002-2.867, для Європи 0.0003-2.222, для Північної Америки 0.0008-4.78. Тест Краскела–Уолліса засвідчив наявність статистично значущого ефекту фактора «континент» на рівень титру ($p < 0.001$), після чого були проведені попарні рангові порівняння за Данном з корекцією Бонферроні для визначення конкретних контрастів між групами (Таблиця 3). Аналіз виконували для вихідних (немодифікованих) значень титру, а логарифмічну шкалу осі Y застосовано виключно для візуалізації розподілу.

Таблиця 3 Попарні рангові порівняння титрів між континентами

Група 1	Група 2	n1	n2	Статистика критерію	р-значення	Скориговане р	Рівень статистичної значущості	Вертикальна позиція для візуалізації
Азія	Європа	33	310	-4,98474937	6,2042E-07	3,7225E-06	***	5,01902653
Африка	Азія	7	33	3,6042934	0,000313	0,00187802	**	5,2580278
Азія	Північна Америка	33	69	-2,77608989	0,0055017	0,0330102	*	5,49702906
Європа	Північна Америка	310	69	2,44301	0,01456533	0,087392	ns	5,73603032
Африка	Північна Америка	7	69	2,29981926	0,02145846	0,12875077	ns	5,97503159
Африка	Європа	7	310	1,53603732	0,12452923	0,74717536	ns	6,21403285

n - кількість зразків у групі.

p - ймовірність отримати спостережувану різницю (або більшу) за умови відсутності реального ефекту між групами.

Медіанні значення титру суттєво варіювали між континентами: найнижчі рівні зафіксовано в Африці (0.08), тоді як найвищі — в Азії (0.83). Європейські популяції характеризувалися зниженими медіанними значеннями (0.23), а Північна Америка демонструвала проміжний рівень (0.58), при цьому результати попарних порівнянь свідчать про статистично вищі значення титру в азійських популяціях, тоді як відмінності між іншими континентами статистично не . Це узгоджується з параметричною асиметрією скрипкових діаграм, де азійські та північноамериканські вибірки представлені ширшими та неоднорідними розподілами.

Графічні результати (violin plot) чітко відображають ці відмінності й підкреслюють, що континентальні групи розрізняються як за рівнем титру, так і за формою його розподілу. Попарні порівняння чітко неоднорідність розподілу титру *Wolbachia* між континентами. Найбільші відмінності зафіксовано між азійськими популяціями та іншими регіонами: титри в Азії статистично значуще відрізнялися від Європи ($p_{adj} < 0.001$), Африки ($p_{adj} < 0.01$) та Північної Америки ($p_{adj} < 0.05$). Водночас між європейськими та північноамериканськими популяціями, а також між африканськими та європейськими популяціями статистично значущих відмінностей не виявлено ($p_{adj} > 0.05$)(Рис. 2). Ці дані свідчать, що просторові чинники — ймовірно пов'язані з кліматичними режимами, історією заселення та генетичними особливостями популяцій — суттєво впливають на варіабельність титру *Wolbachia* у природних популяціях *D. melanogaster*.

Оцінка кореляційних зв'язків між титром *Wolbachia* та географічними координатами показала різну роль широти й довготи у формуванні просторової мінливості титру. Аналіз методом Спірмена виявив слабкий, але статистично значущий негативний зв'язок між титром і широтою ($R = -0.23$, $p = 2 \times 10^{-6}$), що вказує на загальну тенденцію до зниження значень титру у

популяціях, розташованих на вищих широтах. Водночас невисоке абсолютне значення коефіцієнта кореляції свідчить, що широта пояснює лише незначну частку загальної варіації титру, тоді як основна мінливість зберігається між популяціями в межах подібних широтних інтервалів. На відміну від цього, статистично значущого зв'язку між титром і довготою не виявлено ($R = 0.041$, $p = 0.4$), що не дає підстав розглядати довготу як чинник, пов'язаний з кількісними показниками *Wolbachia* (Рис. 1.1 а, б).

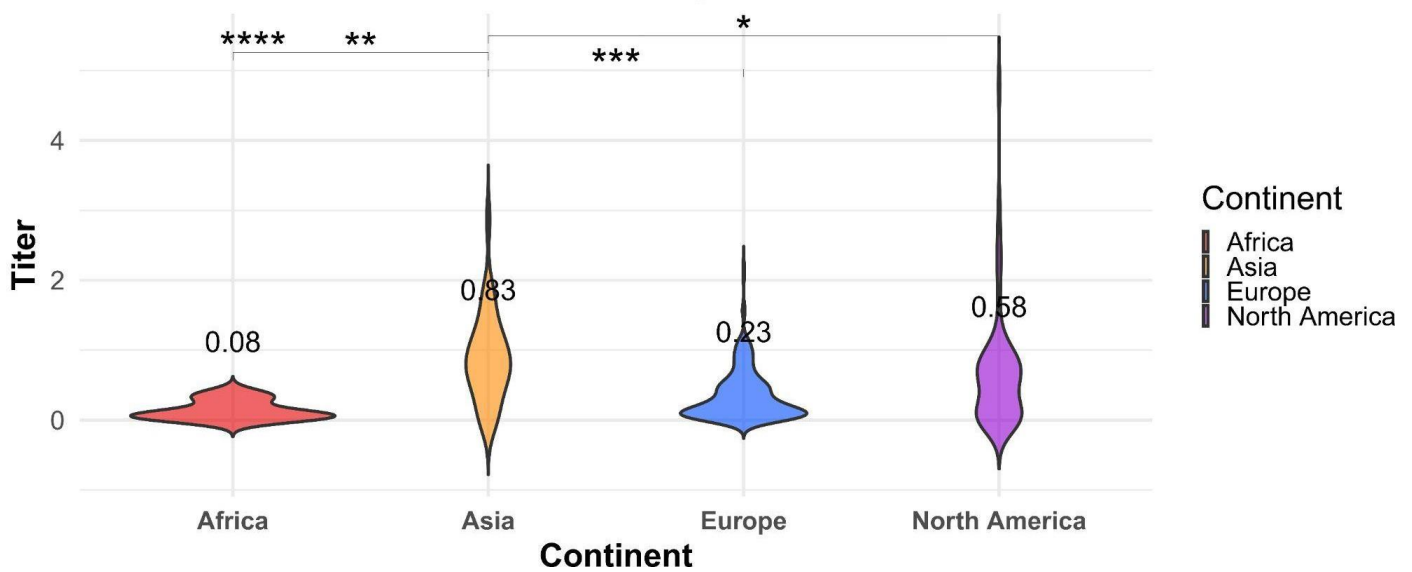


Рис. 2 Географічні відмінності титру *Wolbachia* між континентами. Скрипкова діаграма (violin plot), що відображає форму розподілу титру в межах кожного континенту (Тест Краскела–Уолліса: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

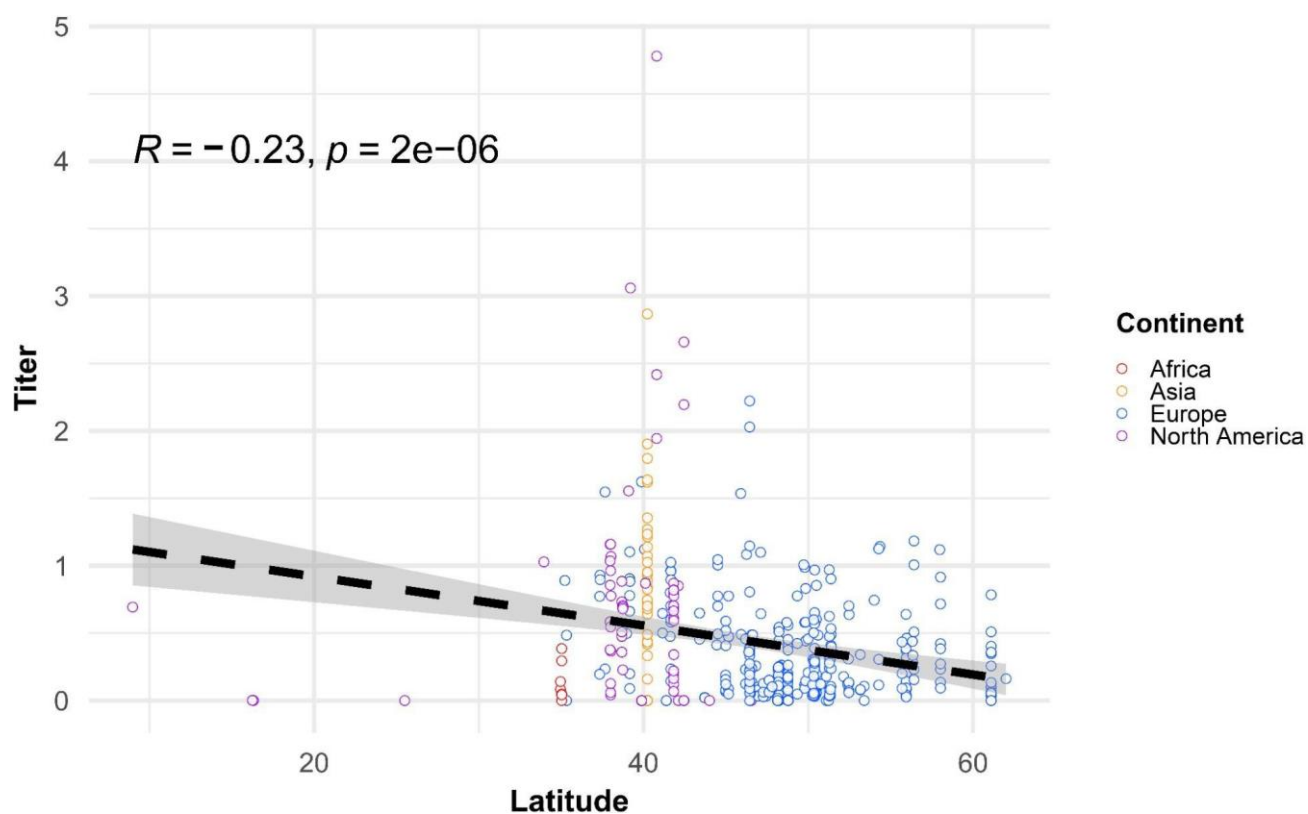


Рис. 2.1. а Кореляції між титром *Wolbachia* та широтою (**R** — коефіцієнт кореляції Спірмена; **p** — рівень статистичної значущості кореляції.)

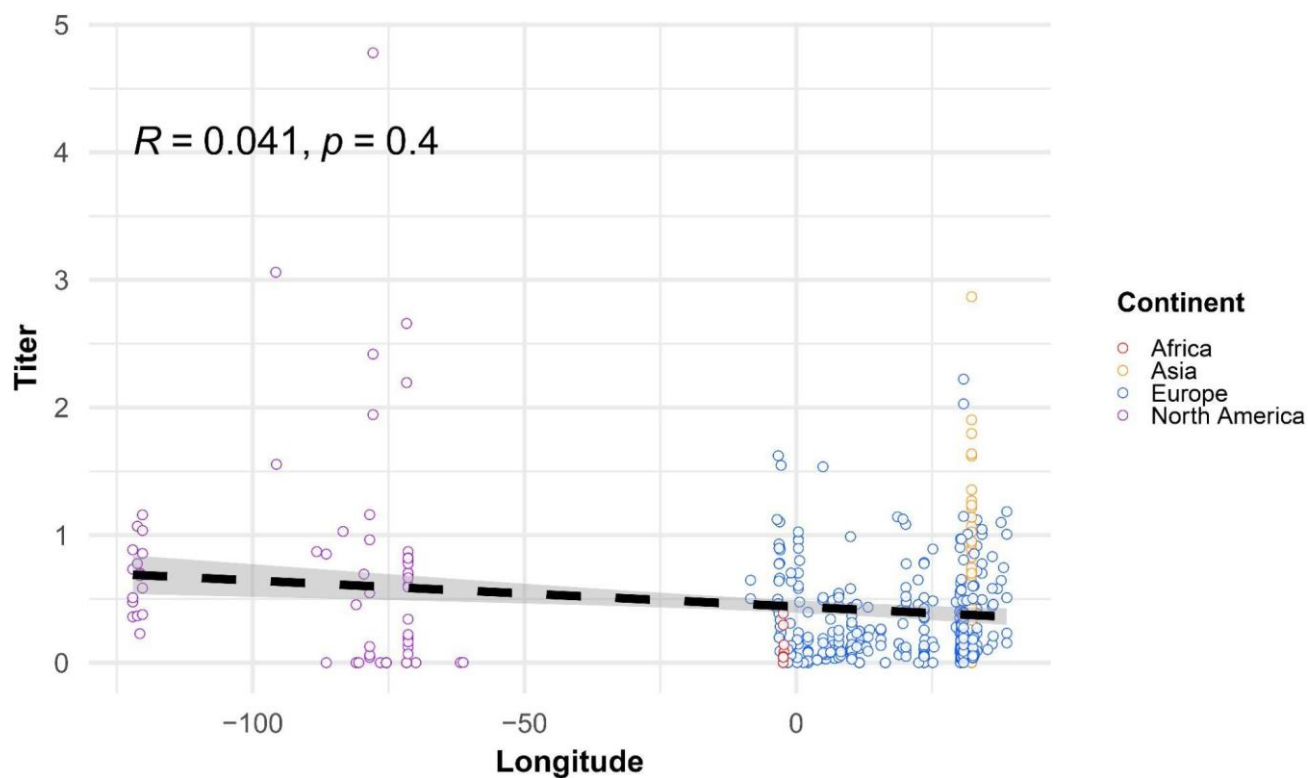


Рис. 2.1. б Графік кореляції між титром *Wolbachia* та широтою

3.3. Часова та сезонна динаміка кількості *Wolbachia*

Для оцінки сезонної та часової динаміки титру *Wolbachia* було проведено кореляційний аналіз між рівнем титру та порядковим днем року (jday) збору проб, окремо для всієї вибірки (Рис. 3.1), та для кожного континенту (Рис. 3.2). Оскільки розподіл титру є істотно ненормальним, кореляції обчислювали за непараметричним коефіцієнтом Спірмана. У загальній вибірці кореляція між титром і днем року була слабо негативною та статистично незначущою (Spearman $R = -0.069$, $p = 0.16$), що свідчить про відсутність єдиного сезонного тренду на глобальному рівні. Аналіз для окремих континентів підтвердив цю тенденцію: у Європі не виявлено значимого зв'язку ($R = 0.0096$, $p = 0.87$), у Північній Америці спостерігалася помірна негативна, але статистично не підтверджена кореляція ($R = -0.19$, $p = 0.11$). В азійських вибірках кореляція була позитивною ($R = 0.27$), але також не досягала рівня значущості ($p = 0.13$), що може бути наслідком малої вибірки та неоднорідності кліматичних умов. Для Африки ($n = 7$) зареєстровано відносно сильний негативний зв'язок ($R = -0.57$), який, є статистично ненадійним через малу кількість зразків ($p = 0.20$).

Візуальний аналіз підтверджує відсутність виражених сезонних закономірностей: на графіках розподілу домінує широка внутрішньоконтинентальна варіабельність, а лінії регресії мають незначний нахил. Додатково варто відзначити, що більшість зразків припадає на літо–осінь, що відображено у кольоровому позначенні сезонів; така асиметрія вибірки також може обмежувати можливість виявлення слабких сезонних ефектів. Таким чином, отримані результати свідчать, що у доступних польових даних титр *Wolbachia* не демонструє градієнта протягом року ні на глобальному, ні на континентальному рівні, а сезонні коливання, ймовірно, не можуть бути однозначно інтерпретовані окремо від впливу локальних екологічних та генетичних факторів.

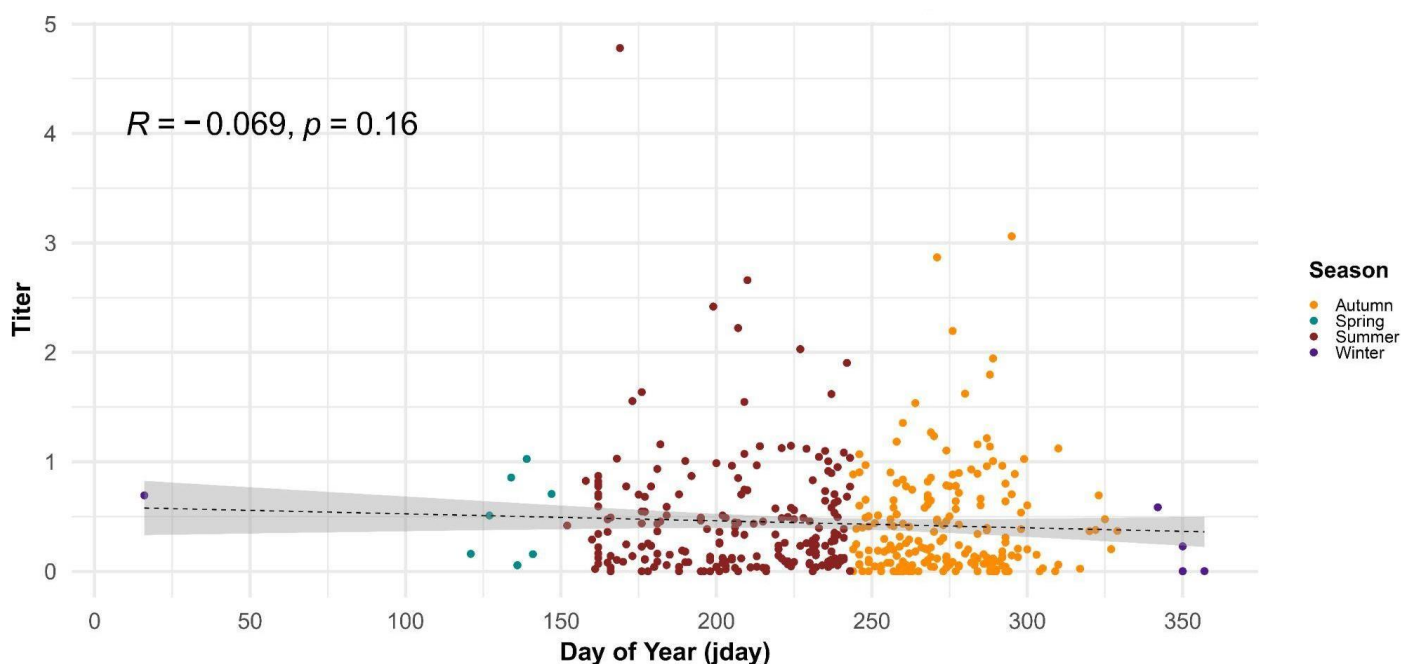


Рис 3.1 Кореляція між титром і порядковим днем року збору (R — коефіцієнт кореляції Спірмена, що відображає напрямок і силу зв'язку між змінними; p — рівень статистичної значущості кореляції.)

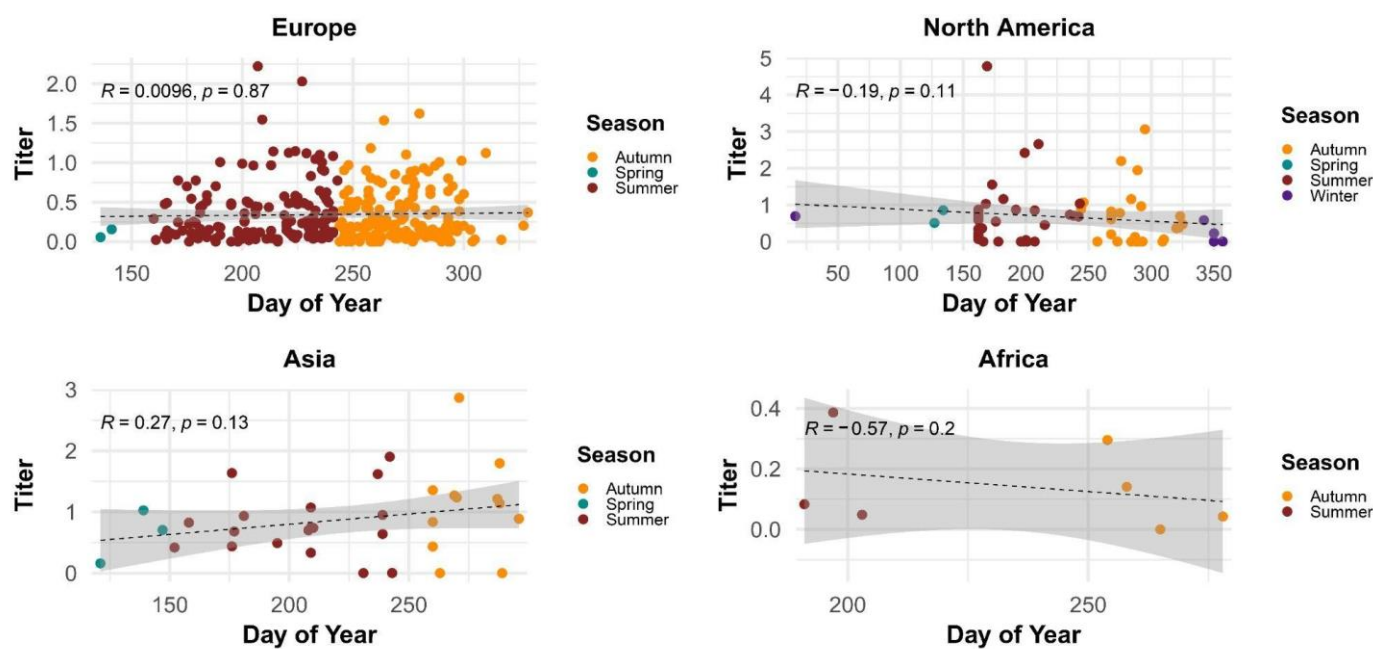


Рис 3.2 Кореляція між титром *Wolbachia* і порядковим днем року збору окремо для кожного континенту

Розподіл титрів *Wolbachia* між сезонами було проаналізовано як у загальній вибірці ($n = 419$), так і окремо для кожного континенту. На загальній діаграмі розмаху (boxplot) сезонні медіани становили: осінь — 0.24, весна — 0.51, літо — 0.31, зима — 0.11, що вказує на виражену

нерівномірність сезонних значень (Рис. 4.1). Однак глобальний тест Краскела–Уолліса не виявив статистично значущих відмінностей ($p > 0.05$), а подальші попарні рангові порівняння за Данном не повернули жодної значущої пари; це свідчить про те, що сезонний ефект, хоча й помітний на графіках, статистично не підтверджений на рівні глобальної вибірки. Такий результат частково пояснюється різною кількістю зразків у сезонах (особливо мало зимових), а також значною варіабельністю титру між індивідами.

Аналіз сезонів у розрізі континентів показав суттєву неоднорідність сезонних патернів. В Європі (найбільша вибірка) медіанні титри були найнижчими навесні (0.11) і вищими восени (0.20) та влітку (0.23), що може відображати сезонні зміни популяційної структури або умов розвитку личинок. У Північній Америці встановлено вищі сезонні медіани — весна 0.68 та літо 0.68, на відміну від осені (0.48) та зими (0.11), причому літні значення відзначаються високою дисперсією. У Азії титри загалом були вищими, ніж у Європі та Африці, з найбільшою медіаною восени (1.18), дещо нижчими улітку (0.72) і навесні (0.71). В Африці, де вибірка обмежена, сезонні значення майже не відрізнялися (осінь 0.09, літо 0.08) (Рис. 4.2).

Загалом сезонні графіки демонструють структурованість розподілів, однак відсутність статистично підтверджених відмінностей у глобальних тестах свідчить, що сезон не є незалежним і сильним детермінантом титру сам по собі. Слід зазначити, що обмеженням проведеного аналізу є те, що сезони визначались формально - за днем року. Але в реальності сезони дуже важко класифікувати через те, що весна у тропічному кліматі буде означати інші умови, ніж весна у помірному кліматі. Тому причиною отриманого результату може бути неоднорідність умов у сезонах з локацій у різних кліматичних зонах. Необхідний більш детальний аналіз сезонної динаміки кількості *Wolbachia* у різних кліматичних зонах окремо.

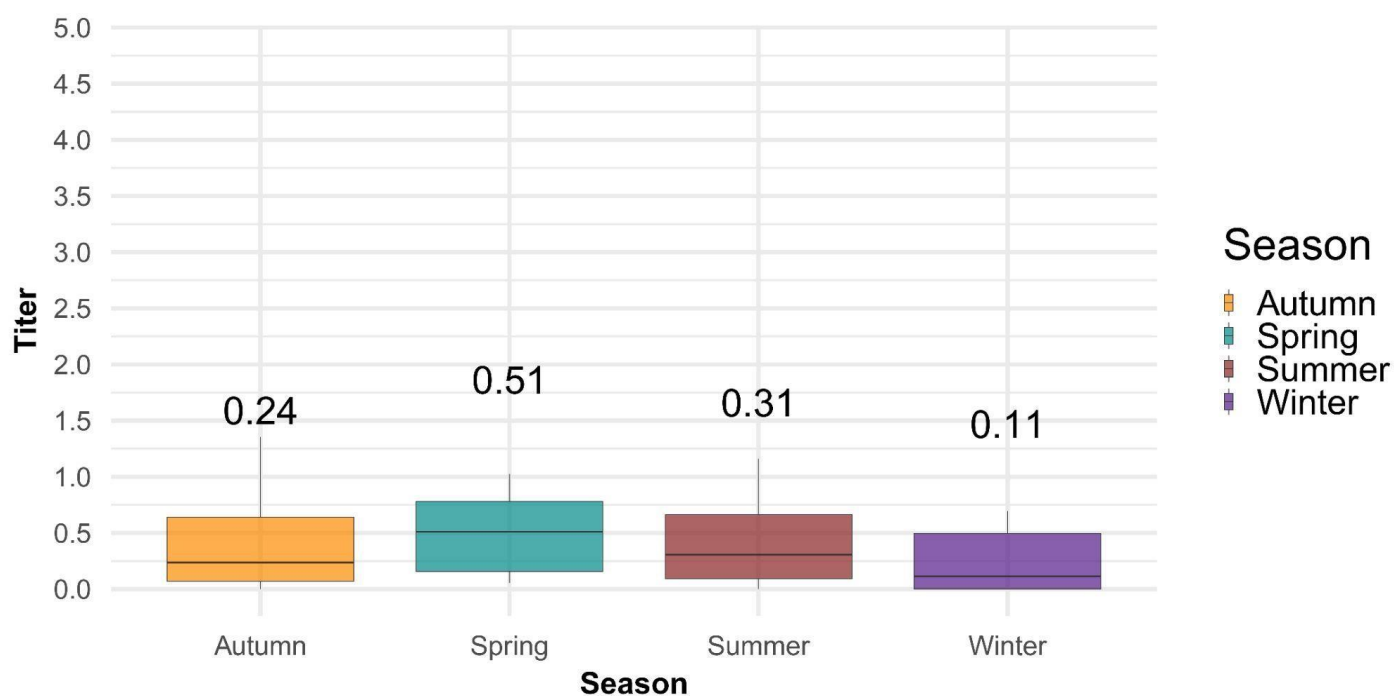


Рис. 4.1 Розподіл титрів за сезонами збору.

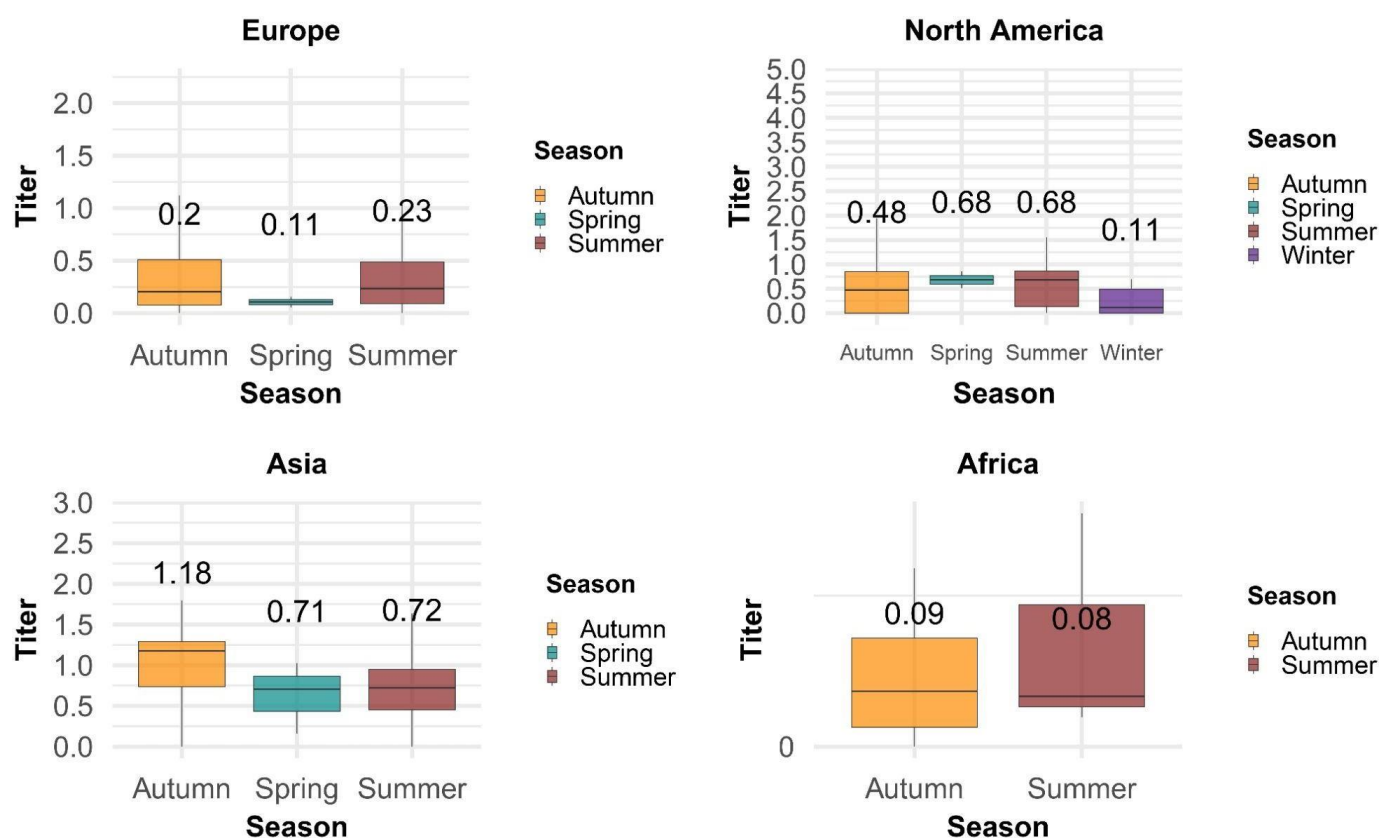


Рис. 4.2 Розподіл титрів *Wolbachia* за сезонами збору окремо для кожного континенту.

Був проведений більш детальний аналіз часової динаміки титру *Wolbachia* для 311 зразків, отриманих із багаторазово відвіданих локацій

протягом досліджуваного періоду. Розподіл значень демонструє високу варіабельність титру між часовими точками: більшість спостережень зосереджена в діапазоні 0.0–1.0, однак у вибірці трапляються поодинокі значення до ~2–3, що вказує на можливість короточасних підвищень бактеріального навантаження в окремих популяціях. Аналіз часових рядів не виявив узгодженого довготривалого тренду — титр не демонструє послідовного зростання чи зниження з роками, а перекриття траєкторій між локаціями свідчить про гетерогенність популяційної динаміки. У межах окремих локацій повторні вимірювання на коротких часових інтервалах характеризуються локальними коливаннями, що узгоджується з чутливістю титру до короточасних змін умов середовища (Рис. 5.1).

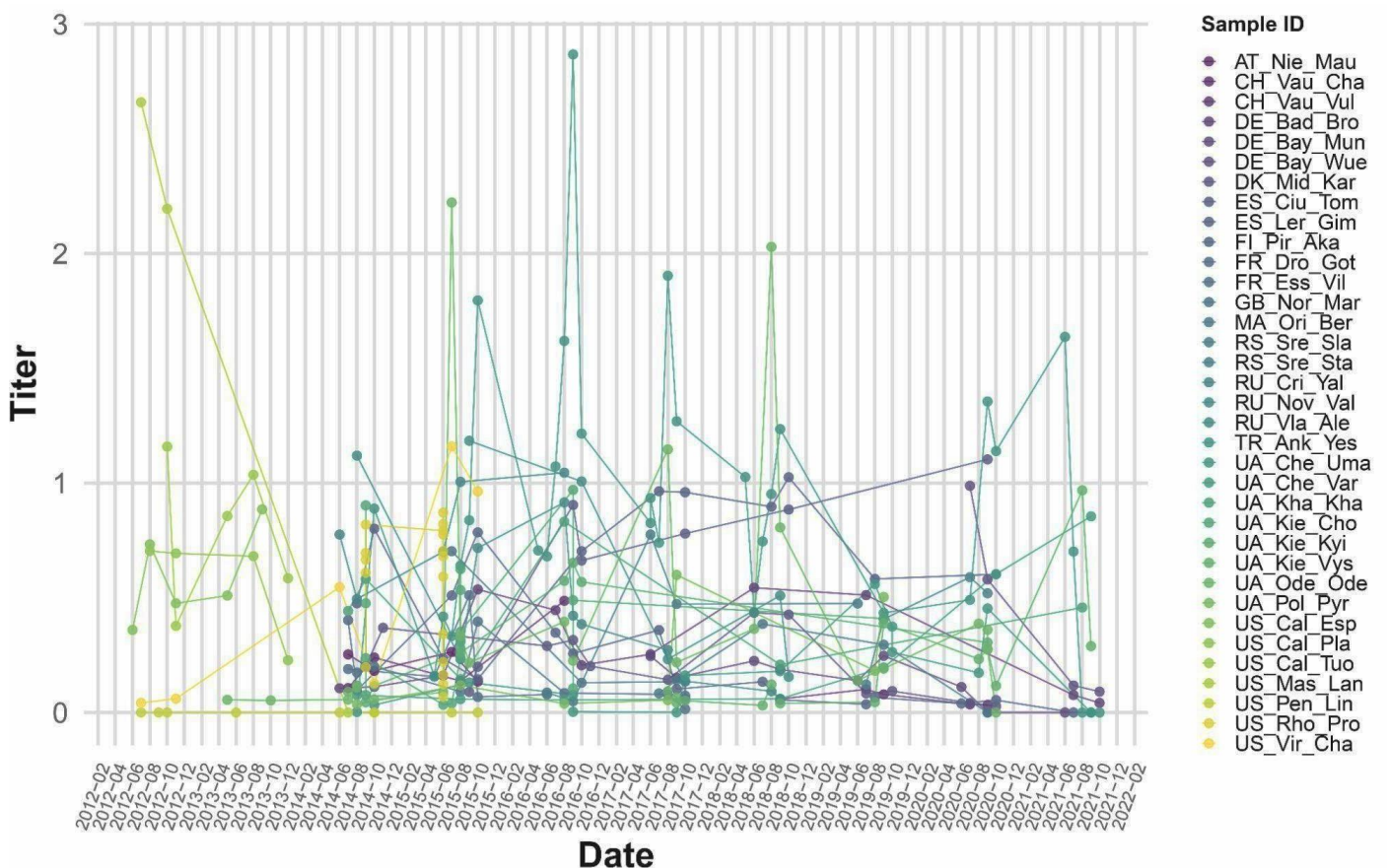


Рис. 5.1 Частотний графік часової динаміки титру зразків з багаторазово відвіданих локацій.

Фасетований графік, де кожен Sample ID зображений окремим субграфіком, дозволяє деталізувати локальні траєкторії змін титру та показує, що агрегована картина приховує суттєві відмінності між популяціями (Рис.

5.2). У більшості локацій титр зберігається на стабільно низькому рівні (близько 0 – 0.3) упродовж усього періоду спостережень, що узгоджується з глобальним домінуванням низьких значень на загальному частотному графіку. Водночас у частини локалітетів видно нерівномірні коливання в межах середніх рівнів (0.3 – 1.0), без формування чіткої сезонної чи річної закономірності, що вказує на ймовірну дію локальних факторів середовища. Окремі локації демонструють короточасні пікові підвищення титру (>1.5), відсутні в більшості інших популяцій. Ці епізодичні стрибки узгоджуються з високими крайовими значеннями, зафіксованими у загальному розподілі. У декількох вибірках помітні напрямні зміни (поступове зростання або спад), але вони не є узагальнюючими для всього набору даних.

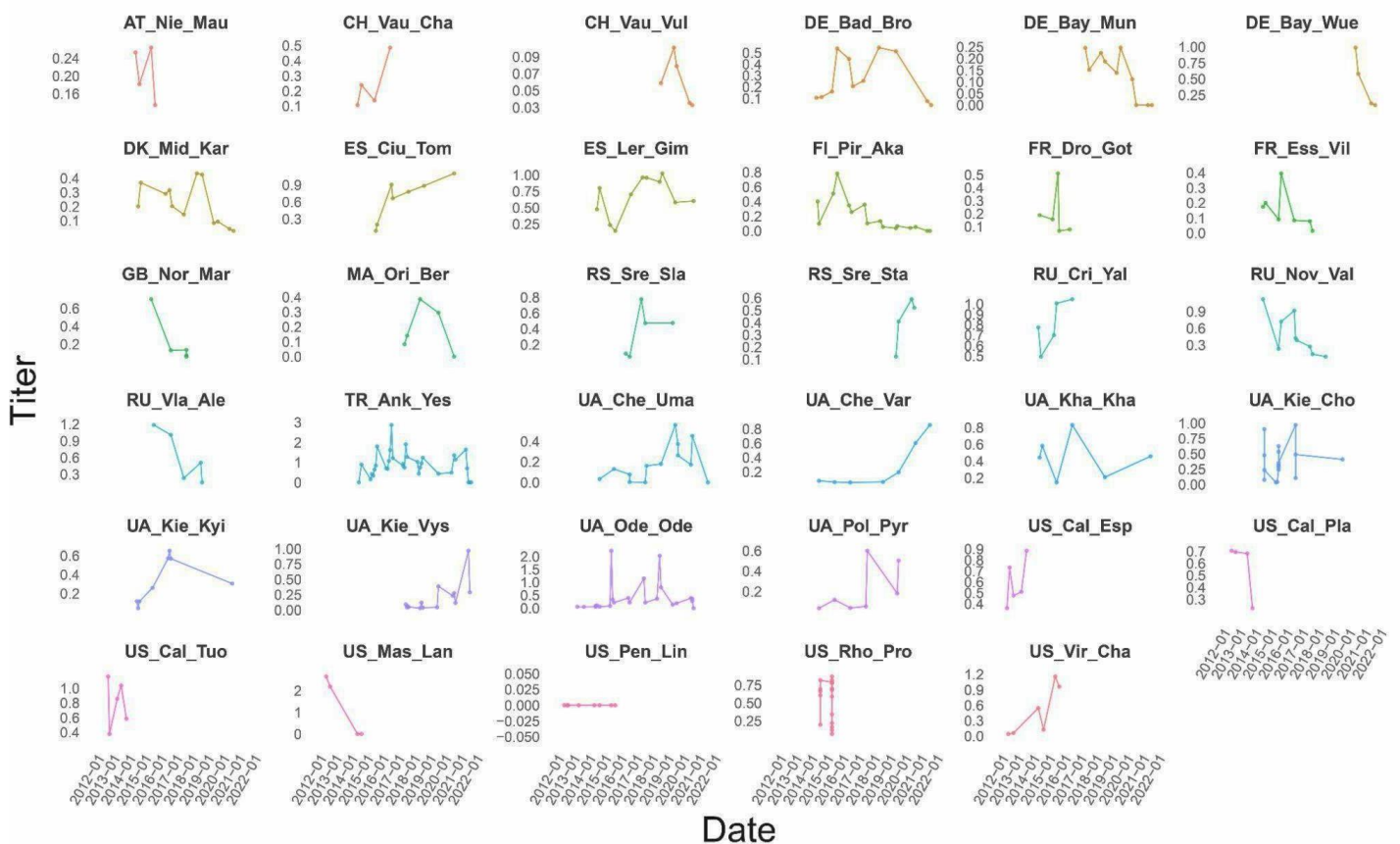


Рис. 5.2 Фасетований графік часової динаміки титру зразків з багаторазово відвіданих локацій.

3.4. Вплив кліматичних факторів на кількість *Wolbachia*

Теплова карта відображає матрицю кореляцій Спірмана між титром *Wolbachia* та шістьма кліматичними змінними, що характеризують середньорічні умови (mean) та внутрішньорічну мінливість (sd) температури, відносної вологості та опадів для кожного локалітету. Вибір кореляції Спірмана обґрунтований тестом Шапіро–Вілکا, за результатами якого був обраний непараметричний підхід для коректної оцінки асоціацій.

На тепловій карті спостерігається чітка структурована картина взаємозв'язків (Рис. 6.1). Титр *Wolbachia* демонструє помірні позитивні кореляції із середньою температурою (T2M_mean) та її варіабельністю (T2M_sd), що узгоджується з відомою термочутливістю симбіозу. З вологістю (RH2M_mean та RH2M_sd) кореляції більш розсіяні та слабші, що свідчить про менш виражений вплив гідротермічних умов на титр. Змінні опадів (PRECTOTCORR_mean та PRECTOTCORR_sd) формують окремий кореляційний кластер і загалом демонструють низький або відсутній зв'язок із титром, що може означати, що опади впливають переважно на демографію господаря, але не безпосередньо на інтенсивність інфекції.

Ієрархічна кластеризація, візуалізована дендрограмами, показує природне групування кліматичних параметрів: блок температурних змінних (T2M_mean, T2M_sd) згрупований разом і розміщений поруч з титром, тоді як змінні вологості та опадів формують окремі кластери. Це свідчить про те, що саме температурні характеристики середовища є найбільш пов'язаними зі значеннями титру *Wolbachia* у природних популяціях *D. melanogaster*. Така просторова структура кореляцій вказує, що кліматичний вплив на симбіоз є багатовимірним, але домінуючим фактором, найімовірніше, виступає температурний режим, що узгоджується з попередніми експериментальними й польовими дослідженнями термочутливості штамів *wMel*.

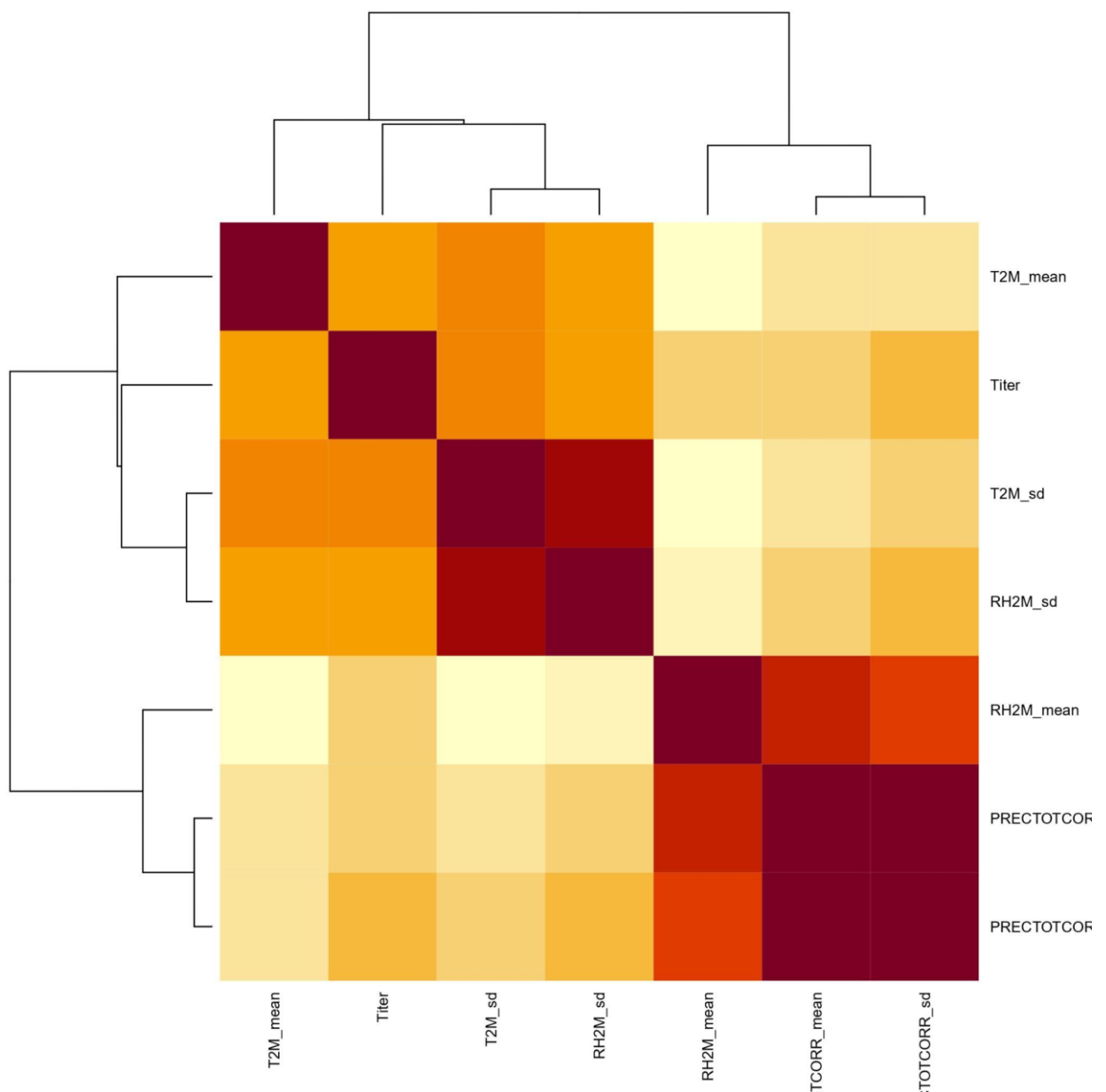


Рис. 6.1 Теплова карта кореляції між титром і кліматичними змінними за методом Спірмана. **T2M mean** — середньорічна температура повітря на висоті 2 м над поверхнею землі, °C. **T2M sd** — стандартне відхилення температури на висоті 2 м. **RH2M mean** — середньорічна відносна вологість повітря (%) на висоті 2 м. **RH2M sd** — стандартне відхилення відносної вологості. **PRECOTCORR_mean** — скоригована середньорічна сума опадів (мм). **PRECOTCORR_sd** — стандартне відхилення сумарних опадів.

Матриця парних кореляцій за коефіцієнтом Спірмана (ρ) дає детальну оцінку непараметричних зв'язків між кліматичними змінними та титром *Wolbachia* і одночасно показує форми розподілів та варіабельність даних. У верхньому трикутнику наведені значення ρ та рівні значущості ($p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$), у нижньому — діаграми розсіювання з локальною апроксимацією (loess), а на головній діагоналі — гістограми кожної змінної (Рис. 6.2).

Кореляційна структура відтворює патерни з теплової карти й уточнює форму зв'язків. Найвищі кореляції спостерігаються між змінними одного типу: PRETOTCORR_mean vs PRETOTCORR_sd: $\rho \approx 0.91$, що свідчить, що регіони з високою сумою опадів мають і високу міжрічну мінливість, та RH2M_mean vs RH2M_sd: $\rho \approx 0.76$ для вологості. Температура демонструє систематичні негативні зв'язки з вологістю, зокрема T2M_mean vs RH2M_mean: $\rho \approx -0.35$, що відповідає відомому кліматичному балансу між теплом і абсолютною вологістю. Нелінійний характер багатьох залежностей (вигнуті, конусоподібні патерни варіації у нижньому трикутнику) підтверджує доцільність використання рангової кореляції Спірмана, яка коректно описує монотонні, але не обов'язково лінійні зв'язки.

Зв'язки між кліматичними змінними та титром загалом слабкі: найбільші коефіцієнти отримано для T2M_sd ($\rho \approx 0.20$) та RH2M_sd ($\rho \approx -0.13$), що узгоджується з тепловою картою й вказує, що мінливість температури та вологості може впливати на титр, але ефект є помірним і нелінійним. Висока розсіяність точок та відсутність чітких трендів у діаграмах розсіювання свідчать про відсутність універсального кліматичного предиктора титру. Кліматичні змінні формують узгоджені температурний, вологісний і опадний кластери, але титр *Wolbachia* не має сильних монотонних зв'язків ні з однією окремою змінною; кліматичний ефект на титр, ймовірно, слабкий, складний і додатково модулюється локальними екологічними та генетичними чинниками.

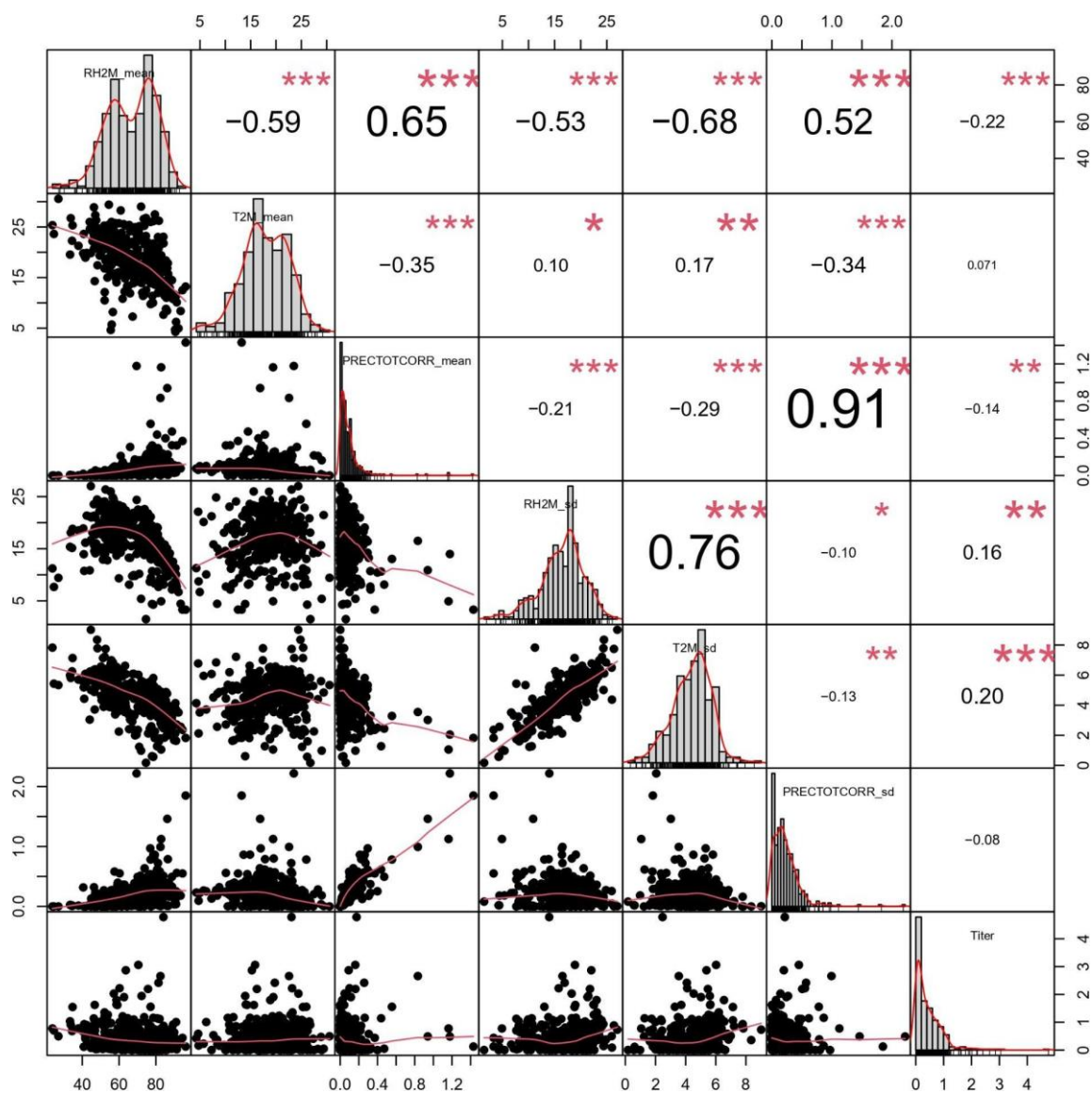


Рис. 6.2 Матриця парних кореляцій (scatterplot matrix), побудована за коефіцієнтом Спірмана

Діаграма спадання дисперсії компонент (Scree plot) відображає внесок кожної головної компоненти (PC) у загальну дисперсію кліматичних змінних та титру *Wolbachia*. Структура розподілу дисперсії демонструє чіткий домінуючий внесок перших трьох компонент. PC1 пояснює 49.6 % загальної мінливості, PC2 — 22.6 %, PC3 — 18.4 %, що разом становить ≈ 90.6 % накопиченої дисперсії. Після PC3 внесок різко зменшується: PC4 забезпечує лише 5.3 %, а PC5 та PC6 — 2.4 % і 1.7 % відповідно. Така різка зміна нахилу кривої («еластичний злам») вказує на те, що інформаційна насиченість компонент різко падає після третьої. Основна структура варіації даних визначається саме PC1–PC3. Це підтверджує доцільність концентрації подальшого аналізу (зокрема biplot-візуалізацій та оцінки навантажень змінних) на перших трьох головних компонентах, які акумулюють майже повну інформаційну структуру кліматичних параметрів. (Рис. 7.1)

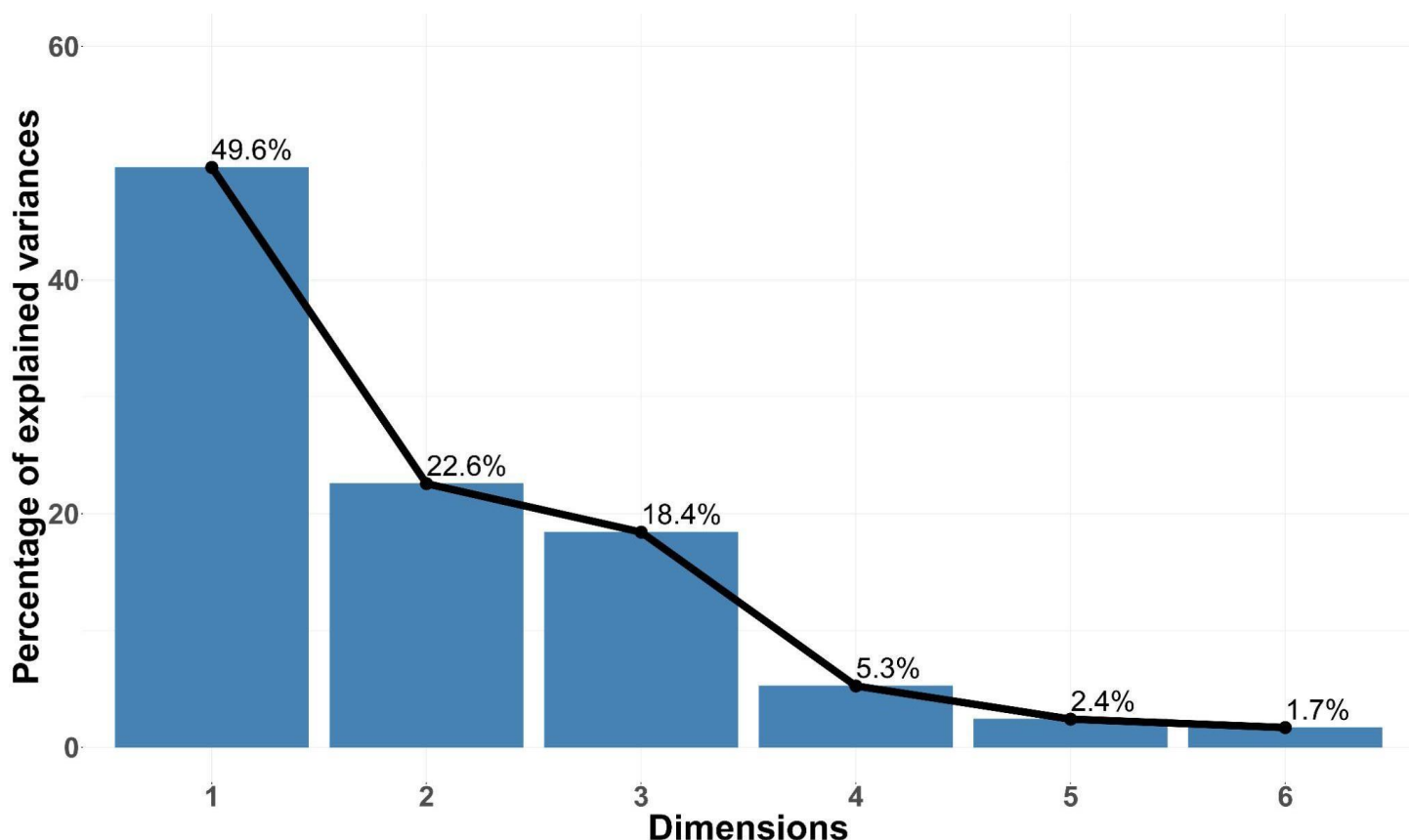


Рис. 7.1 Діаграма спадання дисперсії 6 кліматичних компонент, побудована за результатами PCA (Principal component analysis).

РСА-біплот показує структуру варіації кліматичних змінних у просторі перших двох головних компонент, які разом пояснюють 72.2% дисперсії (PC1 — 49.6%, PC2 — 22.6%). Основний вклад у PC1 (Dim1) вносить середня температура (T2M_mean), вектор якої спрямований вздовж осі PC1, що відображає температурний градієнт від холодних до теплих умов. Вектор середньої вологості (RH2M_mean) орієнтований у протилежний бік, що свідчить про негативний зв'язок між температурою та вологістю (раніше зафіксований як $\rho \approx -0.35$). Другий компонент (Dim2) визначається середньою кількістю опадів (PRECTOTCORR_mean), чий вектор має окремий напрям і формує незалежний опадний градієнт. Розташування зразків по біплоту демонструє безперервність варіації без чітких кластерів, що вказує на плавну екологічну диференціацію. Стрілки кліматичних змінних відображають характерні взаємозв'язки: протиставлення температури вологості на PC1 та відокремлення опадів на PC2. (Рис. 7.2)

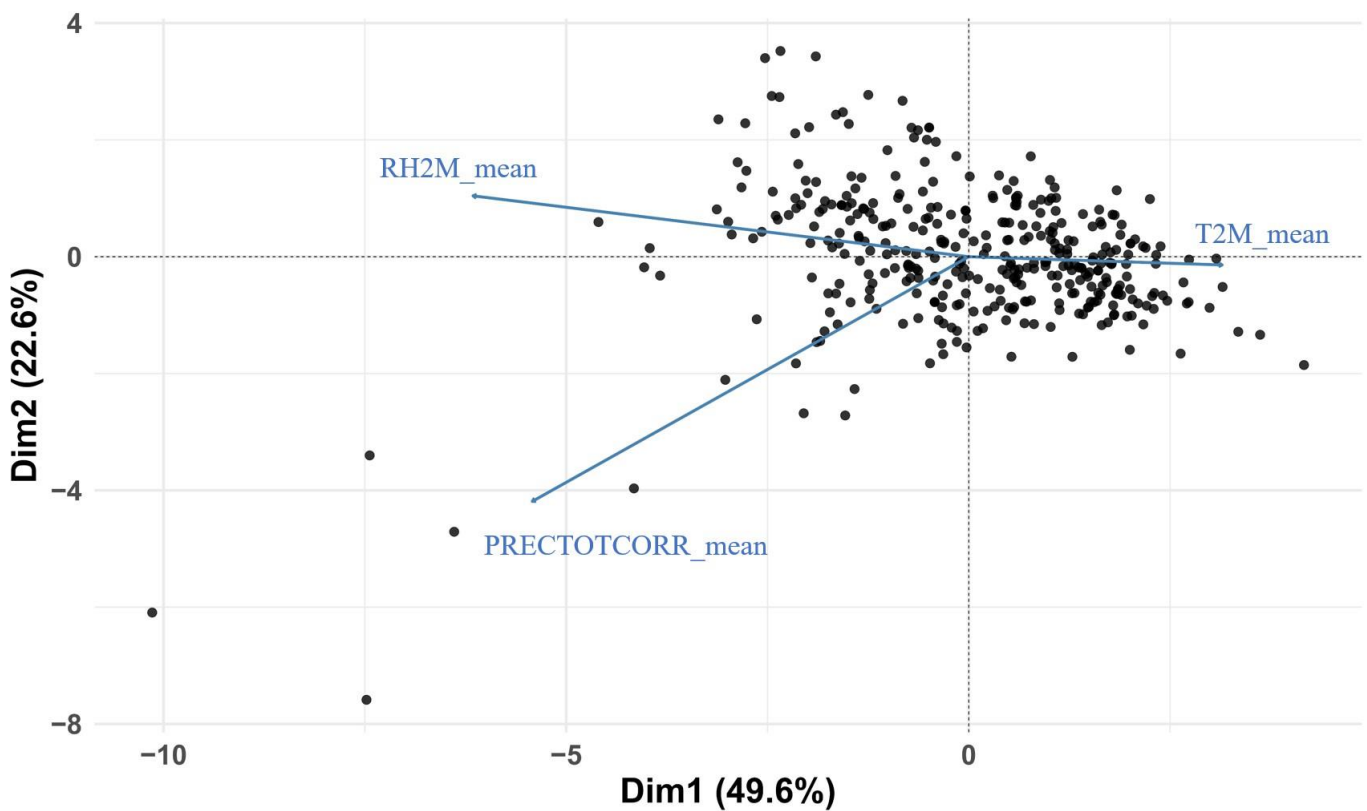


Рис. 7.2 Графічна проекція зразків та змінних у просторі двох перших головних компонент (біплот РСА). Dim1 - перший компонент (PC1), Dim2 - другий компонент (PC2).

Три двовимірні біплоти демонструють проекцію зразків та кліматичних змінних у просторі перших трьох головних компонент PCA, які разом пояснюють 90.6% сумарної дисперсії (49.6% для PC1, 22.6% для PC2 та 18.4% для PC3) (Рис. 7.3). На всіх трьох графіках вектори PRECTOTCORR_mean, RH2M_mean і T2M_mean зберігають стабільні напрямки, що підтверджує узгодженість їхніх кореляційних патернів у різних просторових проекціях.

У площині PC1–PC2 чітко видно, що PRECTOTCORR_mean має найбільший внесок у PC2 (довгий вектор, спрямований вниз), тоді як T2M_mean орієнтований уздовж позитивної осі PC1, відображаючи сильний вплив середньорічної температури на першу компоненту. RH2M_mean спрямований у протилежний бік до T2M_mean, що відповідає їхній негативній кореляції, встановленій у кореляційній матриці та на тепловій карті.

Біплот PC1–PC3 показує, що PRECTOTCORR_mean суттєво впливає і на третю компоненту, тоді як RH2M_mean має значний негативний внесок у PC3. T2M_mean формує вектор спрямований вниз, підтверджуючи від'ємний зв'язок із PC3, що відповідає нерівномірним варіаціям температури, виявленим у змінних T2M_sd.

У проекції PC2–PC3 вологості (RH2M_mean) відповідає найбільший позитивний внесок у PC2, тоді як PRECTOTCORR_mean формує вектор уздовж PC3, відображаючи групування опадних характеристик у третьому компонентному напрямку. T2M_mean демонструє слабший вплив у цій площині, що відповідає зменшенню температурної варіабельності у PC2–PC3 порівняно з PC1.

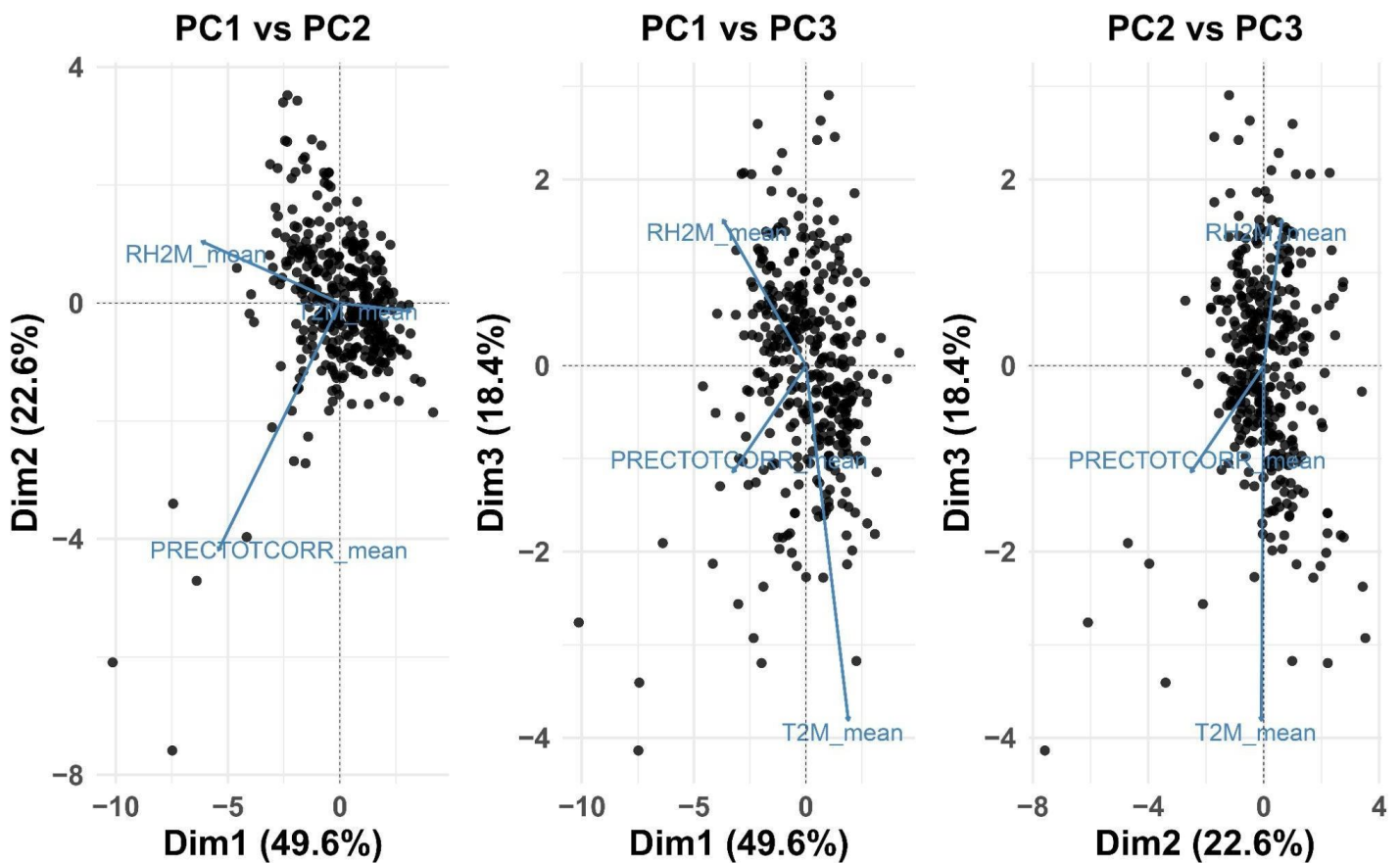


Рис. 7.3 Біплоти головних компонент (PC1–PC2, PC1–PC3 та PC2–PC3), що відображають внесок кліматичних змінних у простір PCA. Dim1 - перший компонент (PC1), Dim2 - другий компонент (PC2), Dim3 - третій компонент (PC3).

3.5. Аналіз лінійних моделей із поступовим додаванням технічних незалежних змінних що впливають на титр *Wolbachia*

Для детальної оцінки внеску технічних, географічних та кліматичних факторів у варіабельність титру *Wolbachia* було побудовано серію лінійних моделей із поступовим додаванням незалежних змінних. Поступове розширення набору незалежних змінних від базової model_0 (*Titer* ~ 1) до повної model_8 показало систематичне покращення якості моделей: AIC монотонно знижувався від 599.34 у model_0 до мінімального значення 589.98 у model_7, після чого у model_8 рівень AIC знову зріс.

Додавання технічних коваріат (Cov, SimCont.Norm) у model_1–model_2 та географічних змінних (lat, long) у model_3–model_4 давало найбільший приріст інформативності, тоді як включення сезонності (model_5) та перших двох кліматичних головних компонент (model_6–model_7) давало помірне, але стабільне покращення моделі. Найкращою моделлю за критерієм Акаїке була model_7, і ΔAIC між model_7 та model_8 (>2) свідчить, що включення PC3 не є статистично виправданим та не підвищує обґрунтованість моделі.

ANOVA для model_7 показала, що статистично значущими незалежними змінними, асоційованими з титром, є покриття секвенування Cov ($p = 0.047$) та головна компонента PC2 ($p = 0.019$), тоді як SimCont.Norm, широта, довгота, сезон збору та PC1 не продемонстрували значущого впливу ($p > 0.05$) (Табл. 4).

Кліматичні компоненти PC1–PC3 показали низькі F-статистики та високі p-значення, що підтверджує їхній слабкий прямий внесок у варіацію титру та узгоджується з кореляційним аналізом, де вплив клімату на титр був нелінійним та слабо монотонним. Просторовий компонент (широта) демонструє стійкий ефект у всіх моделях, що може відображати структурованість популяцій *Drosophila melanogaster* та відмінності у генотипах *Wolbachia* або хазяїна між широтними зонами.

Моделі model_0–model_8 показують, що варіабельність титру *Wolbachia* визначається переважно технічними параметрами секвенування та просторовими факторами, тоді як сезонність і кліматичні PCA-компоненти виконують другорядну роль.

Таблиця 4 Порівняння лінійних моделей із поступовим додаванням незалежних змінних

Cov (Sum Sq / F / p) — секвенувальне покриття геному *D. melanogaster*. суму квадратів фактора (Sum Sq), значення F-критерію та відповідне p-значення з ANOVA.

SimCont.Norm — нормалізований показник континента або регіону походження зразків.

Lat — географічна широта місця збору зразка.

Long — географічна довгота місця збору зразка.

Season — сезон збору зразків (у реальних календарних одиницях або нормалізованому вигляді).

PC1 — перша головна компонента кліматичних предикторів (Principal Component 1).

PC2 — друга головна компонента, що відображає незалежну вісь екологічної варіації.

PC3 — третя головна компонента.

AIC — значення інформаційного критерію Акаїке для відповідної моделі; менші значення свідчать про кращу відповідність моделі даним з урахуванням складності.

Моделі	Предиктори	Cov (Sum Sq / F / p)	SimCont. Norm	Lat	Long	Season	PC1	PC2	PC3	AIC
0	1	—	—	—	—	—	—	—	—	599.34
1	Cov	1.0509 / 3.818 / 0.0517	—	—	—	—	—	—	—	597.53
2	Cov, SimCont. Norm	1.0509 / 3.828 / 0.0511	0.7459 / 2.717 / 0.1001	—	—	—	—	—	—	596.80
3	Cov, SimCont. Norm, lat	1.0509 / 3.851 / 0.0504	0.7459 / 2.734 / 0.0996	0.9190 / 3.368 / 0.0673	—	—	—	—	—	595.41
4	+ long	1.0509 / 3.868 / 0.0499	0.7459 / 2.746 / 0.0984	0.9190 / 3.382 / 0.0667	0.6916 / 2.545 / 0.1117	—	—	—	—	594.84
5	+ season	1.0509 / 3.910 / 0.0487	0.7459 / 2.775 / 0.0966	0.9190 / 3.419 / 0.0656	0.6916 / 2.572 / 0.1095	1.9192 / 2.380 / 0.0693	—	—	—	593.62

6	+ PC1	1.0509 / 3.919 / 0.0485	0.7459 / 2.782 / 0.0962	0.9190 / 3.428 / 0.0649	0.6916 / 2.579 / 0.1091	1.9192 / 2.386 / 0.0688	0.5158 / 1.924 / 0.1663	–	–	593.65
7	+ PC2	1.0509 / 3.967 / 0.0472	0.7459 / 2.816 / 0.0942	0.9190 / 3.469 / 0.0633	0.6916 / 2.610 / 0.1069	1.9192 / 2.415 / 0.0663	0.5158 / 1.947 / 0.1637	1.4749 / 5.568 / 0.0189	–	589.98
8	+ PC3	1.0509 / 3.971 / 0.0470	0.7459 / 2.819 / 0.0940	0.9190 / 3.472 / 0.0632	0.6916 / 2.612 / 0.1068	1.9192 / 2.417 / 0.0667	0.5158 / 1.948 / 0.1636	1.4749 / 5.572 / 0.0187	0.3367 / 1.272 / 0.2601	590.67

3.6. Аналіз лінійних моделей з додаванням грибкових інфекцій, як незалежних змінних що впливають на титр *Wolbachia*

Бінарна матриця присутності або відсутності (1 або 0) грибкових інфекцій у зразках побудована на основі даних частки геномного покриття (breadthFraction) грибкового геному відносно всього метагеномного покриття зразку. Конвертація числового значення частки покриття грибкового геному в бінарну форму зроблена за таким правилом - $\text{breadthFraction} > 0.01 = 1$, $\text{breadthFraction} < 0.01 = 0$. Для більш точних результатів моделі зв'язку титру з присутністю грибів побудовані з використанням 30 видів, кожний з яких зустрічається в 10 або більше популяційних зразках *D. melanogaster*. (Табл. 5) Створено 5 моделей, в кожній з яких присутній набір основних 6 параметрів і група з 5 видів грибів.

Таблиця 5 Перелік грибкових таксонів, включених до лінійних моделей, та кількість зразків *Drosophila melanogaster*, у яких їх виявлено

№	Грибковий таксон (вид / група видів)	Кількість зразків
1	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	336
2	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	92
3	<i>Pichia kluyveri</i>	341
4	<i>Saccharomyces arboricola</i>	39
5	<i>Saccharomyces cariocanus</i> / <i>Saccharomyces paradoxus</i>	28
6	<i>Starmerella bacillaris</i>	316
7	<i>Sydowia polyspora</i>	14
8	<i>Pichia kudriavzevii</i>	166
9	<i>Clavispora lusitaniae</i>	29
10	<i>Penicillium digitatum</i>	69
11	<i>Penicillium solitum</i> / <i>P. chrysogenum</i> / <i>P. polonicum</i> / <i>P. nordicum</i>	70
12	<i>Debaryomyces hansenii</i>	33
13	<i>Penicillium roqueforti</i>	65
14	<i>Zygosaccharomyces parabailii</i>	35
15	<i>Aspergillus tubingensis</i> / <i>A. luchuensis</i> / <i>A. niger</i>	23
16	<i>Candida orthopsilosis</i>	11
17	<i>Geotrichum candidum</i>	153

18	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	39
19	<i>Penicillium citrinum</i>	11
20	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	11
21	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	16
22	<i>Wickerhamomyces pijperi</i>	42
23	<i>Candida intermedia</i>	12
24	<i>Monilinia laxa</i>	23
25	<i>Candida parapsilosis</i>	12
26	<i>Magnusiomyces magnusii</i>	30
27	<i>Alternaria alternata</i>	12
28	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	22
29	<i>Lachancea thermotolerans</i>	10
30	<i>Malassezia restricta</i>	11

Набір лінійних моделей, побудованих для оцінки внеску грибкових інфекцій у варіацію титру *Wolbachia*, продемонстрував виражені відмінності за інформаційною придатністю, що відображено у значеннях AIC (табл. 6). Найнижче значення AIC отримала Fmodel_3 (AIC = 437.14), яка включала найбільший кластер грибів, зокрема представників родів *Penicillium* та *Penicillium solitum*. Значення ваги Акаїке для цієї моделі становило 0.98, що свідчить про її домінування серед розглянутих альтернатив.

Наступною за інформативністю була Fmodel_2 (AIC = 445.49, $\Delta AIC = 8.35$), до складу якої входили *Starmerella bacillaris* та *Sydowia* sp., однак її

пояснювальний потенціал був суттєво нижчим. Fmodel_4 (AIC = 454.47, Δ AIC = 17.33), що включала *Candida orthopsilosis* та *Geotrichum* sp., і Fmodel_5 (AIC = 461.26, Δ AIC = 24.12) з *Monilinia laxa* та *Candida parapsilosis* характеризувалися ще гіршою відповідністю даним. Найменш інформативною серед грибних моделей була Fmodel_1 (AIC = 465.85, Δ AIC = 28.71), яка включала *Hanseniaspora uvarum* та *Metschnikowia* sp. Загалом результати вказують, що лише обмежене коло грибних таксонів демонструє помітний зв'язок із варіацією титру *Wolbachia*, тоді як інші мають слабкий внесок.

Для оцінки відносного внеску грибів всі моделі було об'єднано в єдиний набір і проранжовано за AIC, Δ AIC та вагами Акаїке (табл. 7). Узагальнений аналіз показав, що всі моделі з грибними змінними суттєво переважають базові моделі за якістю опису варіації титру *Wolbachia*. Найкращою моделлю в усьому наборі залишалася Fmodel_3 (AIC = 437.14, Δ AIC = 0, вага Акаїке = 0.98), тоді як найкраща базова модель (model7) мала значно гірший показник (AIC = 589.98, Δ AIC = 152.84). Жодна з базових моделей не потрапила до зони статистичної конкурентності (Δ AIC $\leq$ 2), що свідчить про вкрай обмежену пояснювальну здатність моделей без грибкових змінних. Сукупно ці результати демонструють, що врахування структури грибного метабеному різко покращує відповідність моделей емпіричним даним і відіграє значно більшу роль у поясненні варіації титру *Wolbachia*, ніж технічні, географічні або кліматичні змінні, включені до базових моделей.

Таблиця 6 Порівняння лінійних моделей з поступовим додаванням грибів

Модель	Гриби у моделі	AIC	Статистично значущі види ($p < 0.05$)
Fmodel_3	<i>Penicillium solitum</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium polonicum</i> , <i>Penicillium nordicum</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> , <i>Zygosaccharomyces parabailii</i> , <i>Aspergillus</i> <i>tubingensis</i> , <i>Aspergillus luchuensis</i> , <i>Aspergillus</i> <i>niger</i>	437,1407	<i>Zygosaccharomyces parabailii</i>
Fmodel_4	<i>Candida orthopsilosis</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Meyerozyma guilliermondii</i> , <i>Saccharomyces</i> <i>paradoxus</i> , <i>Wickerhamomyces pijperi</i>	445,4936	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
Fmodel_2	<i>Starmerella bacillaris</i> , <i>Sydowia polyspora</i> , <i>Pichia</i> <i>kudriavzevii</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Penicillium</i> <i>digitatum</i>	454,4719	<i>Starmerella bacillaris</i> , <i>Pichia</i> <i>kudriavzevii</i>
Fmodel_1	<i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Metschnikowia</i> <i>reukaufii</i> , <i>Pichia kluyveri</i> , <i>Saccharomyces</i> <i>arboricola</i> , <i>Saccharomyces cariocanus</i> , <i>Saccharomyces paradoxus</i>	461,2595	<i>Pichia kluyveri</i> , <i>Metschnikowia</i> <i>reukaufii</i>
Fmodel_5	<i>Monilinia laxa</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Magnusiomyces magnusii</i> , <i>Cladosporium</i> <i>sphaerospermum</i>	465,8541	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>

Таблиця 7 Загальне порівняння лінійних моделей

Model	AIC	ΔAIC	Akaike weight	Model type
Fmodel_3	437,1407	0.0000	0,9847	with fungi
Fmodel_2	445,4936	8,3528	0,0151	with fungi
Fmodel_4	454,4719	17,3312	0,0001	with fungi
Fmodel_5	461.2595	24,1188	5.7012e-06	with fungi
Fmodel_1	465.8541	28,7133	5.7316e-07	with fungi
model7	589.9770	152,8362	6.3876e-34	basic
model8	590.6695	153,5287	4.5182e-34	basic
model5	593.6171	156,4764	1.0349e-34	basic
model6	593.6521	156,5113	1.017e-34	basic
model4	594.8412	157,7004	5.6115e-35	basic
model3	595.4113	158,2706	4.2197e-35	basic
model2	596.8003	159,6595	2.107e-35	basic
model1	597.5291	160,3883	1.4636e-35	basic
model0	599.3409	162,2001	5.9155e-36	basic

РОЗДІЛ 4

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Отримані результати підтверджують, що у природних популяціях *D. melanogaster* кількісні характеристики *Wolbachia* характеризуються високою просторовою мінливістю. На відміну від більшості попередніх робіт, зокрема Gora et al. (2020), де основним параметром аналізу була частота інфікування, у цій роботі розглядався титр *Wolbachia*, який відображає рівень бактеріального навантаження в популяційних зразках. Це принципово інший рівень організації симбіозу, тому пряме кількісне порівняння з даними про частоти інфекції є обмеженим. Водночас загальна висока варіабельність обох показників узгоджено свідчить про відсутність універсального глобального патерну поширення *Wolbachia*.

Порівняння результатів між континентами показало, що азійські популяції характеризуються статистично вищими значеннями титру *Wolbachia*, тоді як між Африкою, Європою та Північною Америкою значущих відмінностей не виявлено. Водночас для частот інфікування в природних популяціях *D. melanogaster* описано інший міжконтинентальний патерн: у роботі Gora et al. (2020) виявлено статистично значущі відмінності частот інфікування *Wolbachia* (Kruskal–Wallis, $p < 0.05$), причому найвищі значення зафіксовано в популяціях Центральної та Південної Америки (0.6–0.9), тоді як у популяціях Африки, Австралії та Євразії частоти були нижчими; для Євразії характерні значення переважно знаходилися в межах 0.1–0.4 і були статистично нижчими, ніж в Австралії та Північній Америці. Така розбіжність між міжконтинентальними патернами титру та частот інфікування свідчить про те, що навіть за подібних рівнів інфікованості популяції можуть істотно відрізнятися за внутрішньою кількістю симбіонта, що, ймовірно, відображає відмінності в регуляції взаємодії «хазяїн–*Wolbachia*».

Аналіз часової та сезонної динаміки не виявив стійких або універсальних змін титру *Wolbachia* впродовж року. Це узгоджується з низкою попередніх досліджень, у яких сезонність або не проявлялася, або була контекстзалежною і регіонально специфічною [27, 28]. Кліматичні фактори, які в роботі Gora et al. (2020) асоціювалися з варіаціями частот інфікування, у нашому дослідженні виявили слабкий прямий зв'язок із титром *Wolbachia*. Це може бути пов'язано зі значною гетерогенністю титру, який залежить від багатьох факторів, наприклад, від віку особин, який неможливо проконтролювати у зразках з природи. Головні компоненти кліматичних змінних не були сильними предикторами кількісного навантаження симбіонта, що узгоджується з глобальними оглядами, де клімат розглядається як модулюючий, але не визначальний чинник для *Wolbachia*. Це дозволяє припустити, що кліматичні умови впливають радше на стабільність інфекції в популяції, ніж на рівень бактеріальної чисельності всередині хазяїна.

Включення грибкових інфекцій у моделі продемонструвало, що біотичні чинники можуть бути пов'язані з варіацією титру *Wolbachia* у природних умовах. Виявлені асоціації узгоджуються з експериментальними даними про роль *Wolbachia* у взаємодіях із грибковими патогенами та потенційній імуномодуляції хазяїна [3, 21]. Разом з тим отримані результати мають кореляційний характер і не дозволяють робити остаточні висновки щодо причинності, проте підкреслюють, що біотичне оточення є важливим компонентом коеволюційної динаміки системи *Wolbachia–Drosophila*.

Застосування серії лінійних моделей з різними комбінаціями незалежних змінних дозволило оцінити, які групи факторів є найважливішими для пояснення глобальної варіабельності титру *Wolbachia* у природних популяціях *D. melanogaster*. Порівняння моделей за інформаційним критерієм Акаїке показало, що найкраще структуру даних відтворюють моделі, які поєднують технічні параметри секвенування з

просторовими та окремими кліматичними змінними, тоді як включення повного набору кліматичних предикторів або біотичних факторів не приводить до істотного покращення якості апроксимації. У сукупності ці результати підтверджують, що титр *Wolbachia* є інтегральною характеристикою симбіозу, на яку одночасно впливають технічні особливості отримання даних, екологічні умови та біологічні фактори такі як грибкові інфекції, що необхідно враховувати при інтерпретації популяційно-геномних досліджень.

ВИСНОВКИ

1. У природних популяціях *D. melanogaster* виявлено високу варіабельність кількості ендосимбіотичної бактерії *Wolbachia*: титр у об'єднаних (pool-seq) зразках з природи коливався від 0 до 4.78.
2. Широта має статистично значущий вплив на варіації титру *Wolbachia* у природних популяціях *D. melanogaster*. Натомість довгота не демонструє статистично значущого впливу, що свідчить про відсутність вираженого західно-східного градієнта у кількості симбіонта.
3. Медіанні титри бактерії були статистично вищими у природних популяціях Азії (медіана 0.83) порівняно з популяціями Європи (медіана 0.23), Північної Америки (медіана 0.58) та Африки (медіана 0.08; критерій Краскела—Уолліса, $p < 0.001$). Водночас у межах кожного континенту спостерігалася істотна внутрішньоконтинентальна варіабельність значень титру ендосимбіонта.
4. Аналіз часової динаміки титрів *Wolbachia* показав відсутність значимих відмінностей між сезонами збору зразків природних популяцій, проте наявна часова варіабельність у 35 популяціях.
5. Кліматичні фактори в цілому мали слабкий прямий вплив на варіабельність титру *Wolbachia* (LM, $F = 5.57$, $p = 0.019$).

6. Грибкові таксони *Zygosaccharomyces parabailii*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Starmerella bacillaris*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia kluyveri*, *Metschnikowia reukaufii* і *Cladosporium sphaerospermum* асоціюються зі змінами титру *Wolbachia* у природних популяціях *D.melanogaster*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. **Kaur R., Shropshire J. D., Cross K. L. та ін.** Living in the endosymbiotic world of *Wolbachia*: A centennial review. *Cell Host & Microbe*. 2021;29(6):879–893. DOI: 10.1016/j.chom.2021.03.006.
2. **Werren J. H., Baldo L., Clark M. E.** *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*. 2008;6(10):741–751. DOI: 10.1038/nrmicro1969.
3. **Brownlie J. C., Johnson K. N.** Symbiont-mediated protection in insect hosts. *Trends in Microbiology*. 2009;17(8):348–354. DOI: 10.1016/j.tim.2009.05.005.
4. **Richardson M. F., Weinert L. A., Welch J. J., Linheiro R. S., Magwire M. M., Jiggins F. M., Bergman C. M.** Population genomics of the *Wolbachia* endosymbiont in *Drosophila melanogaster*. *PLOS Genetics*. 2012;8(12):e1003129. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003129.
5. **Early A. M., Clark A. G.** Monophyly of *Wolbachia pipientis* genomes within *Drosophila melanogaster*: geographic structuring, titre variation and host effects across five populations. *Molecular Ecology*. 2013;22(23):5765–5778. DOI: 10.1111/mec.12530.

6. **Drosophila Evolution over Space and Time (DEST 2.0) population genomics browser** [Електронний ресурс]. URL: <https://dest-bio2.uab.cat/>.
7. **Nunez J. C. B., Coronado-Zamora M., Gautier M., Kapun M. та ін.** Footprints of worldwide adaptation in structured populations of *Drosophila melanogaster* through the expanded DEST 2.0 genomic resource. *Molecular Biology and Evolution*. 2025;42(8):msaf132. DOI: 10.1093/molbev/msaf132.
8. **Hyder M., Lodhi A. M., Wang Z., Bukero A., Gao J., Mao R.** Wolbachia interactions with diverse insect hosts: from reproductive modulations to sustainable pest management strategies. *Biology*. 2024;13(3):151. DOI: 10.3390/biology13030151.
9. **Lo N., Paraskevopoulos C., Bourtzis K., O'Neill S. L., Werren J. H., Bordenstein S. R., Bandi C.** Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007;57(3):654–657. DOI: 10.1099/ijls.0.64515-0.
10. **Microbial symbionts: functions and molecular interactions on host** / ed. by Dhanasekaran Dharumadurai. Academic Press, 2022. 964 p. ISBN 978-0-323-99334-0.
11. **Stouthamer R., Breeuwer J. A. J., Hurst G. D. D.** *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Review of Microbiology*. 1999;53:71–102. DOI: 10.1146/annurev.micro.53.1.71.
12. **McGraw E. A., O'Neill S. L.** Evolution of *Wolbachia pipientis* transmission dynamics in insects. *Trends in Microbiology*. 1999;7(7):297–302. DOI:

10.1016/S0966-842X(99)01531-0.

13. **Russell S. L., Lemseffer N., White P. M., Sullivan W. T.** Wolbachia and host germline components compete for kinesin-mediated transport to the posterior pole of the *Drosophila* oocyte. *PLOS Pathogens*. 2018;14(8):e1007216. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007216.
14. **Hague M. T. J., Wheeler T. B., Cooper B. S.** Comparative analysis of *Wolbachia* maternal transmission and localization in host ovaries. *Communications Biology*. 2024;7:727. DOI: 10.1038/s42003-024-06431-y.
15. **Newton I. L. G., Clark M. E., Kent B. N., Bordenstein S. R., Qu J., Richards S., Kelkar Y. D., Werren J. H.** Comparative genomics of two closely related *Wolbachia* with different reproductive effects on hosts. *Genome Biology and Evolution*. 2016;8(5):1526–1542. DOI: 10.1093/gbe/evw096.
16. **Brownlie J. C., O'Neill S. L.** *Wolbachia* genomes: insights into an intracellular lifestyle. *Current Biology*. 2005;15(13):R507–R509. DOI: 10.1016/j.cub.2005.06.029.
17. **Rice D. W., Sheehan K. B., Newton I. L. G.** Large-scale identification of *Wolbachia pipientis* effectors. *Genome Biology and Evolution*. 2017;9(7):1925–1937. DOI: 10.1093/gbe/evx139.
18. **Jiménez N. E., Gerdtsen Z. P., Olivera-Nappa Á., Salgado J. C., Conca C.** A systems biology approach for studying *Wolbachia* metabolism reveals points of interaction with its host in the context of arboviral infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2019;13(8):e0007678. DOI:

- 10.1371/journal.pntd.0007678.
19. **Chrostek E., Teixeira L.** Mutualism breakdown by amplification of *Wolbachia* genes. *PLOS Biology*. 2015;13(2):e1002065. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002065.
 20. **Kajtoch L.** Evolutionary and ecological signals in *Wolbachia*–beetle relationships: a review. *European Journal of Entomology*. 2022;119:215–226. DOI: 10.14411/eje.2022.023.
 21. **Manoj R. R. S., Latrofa M. S., Epis S., Otranto D.** *Wolbachia*: endosymbiont of onchocercid nematodes and their vectors. *Parasites & Vectors*. 2021;14:245. DOI: 10.1186/s13071-021-04742-1.
 22. **Engl T.** Reproductive manipulation: *Wolbachia* induce host parthenogenesis using a stolen transformer. *Current Biology*. 2024;34(11):R547–R549. DOI: 10.1016/j.cub.2024.04.076.
 23. **Perlmutter J. I., Atadurdyeva A., Schedl M. E. та ін.** *Wolbachia* enhances the survival of *Drosophila* infected with fungal pathogens. *BMC Biology*. 2025;23:42. DOI: 10.1186/s12915-025-02130-0.
 24. **Zhang H.-B., Qin Q.-L., Wu Y.-R. та ін.** Metabolomics provide new insights into mechanisms of *Wolbachia*-induced paternal defects in *Drosophila melanogaster*. *PLOS Pathogens*. 2021;17(8):e1009859. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009859.
 25. **Min K. T., Benzer S.** *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1997;94(20):10792–10796. DOI:

10.1073/pnas.94.20.10792.

26. **Charlesworth J., Weinert L. A., Araujo E. V., Welch J. J.** *Wolbachia*, *Cardinium* and climate: an analysis of global data. *Biology Letters*. 2019;15(8):20190273. DOI: 10.1098/rsbl.2019.0273.
27. **Gora N. V., Serga S. V., Maistrenko O. M., Ślęzak-Parnikoza A., Parnikoza I. Yu., Tarasiuk A. N., Demydova S. V., Kozeretska I. A.** Climate Factors and *Wolbachia* Infection Frequencies in Natural Populations of *Drosophila melanogaster*. *Cytology and Genetics*. 2020;54(3):189–198. DOI: 10.3103/S0095452720030044.
28. **Kriesner P., Conner W. R., Weeks A. R., Turelli M., Hoffmann A. A.** Persistence of a *Wolbachia* infection frequency cline in *Drosophila melanogaster* and the possible role of reproductive dormancy. *Evolution*. 2016;70(5):979–997. DOI: 10.1111/evo.12923.
29. **Serga S., Maistrenko O., Rozhok A., Mousseau T., Kozeretska I.** Fecundity as one of possible factors contributing to the dominance of the wMel genotype of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Symbiosis*. 2014;63(1):11–17. DOI: 10.1007/s13199-014-0283-1.
30. **Fallon A. M.** Growth and maintenance of *Wolbachia* in insect cell lines. *Insects*. 2021;12(8):706. DOI: 10.3390/insects12080706.
31. **Gutzwiller F., Carmo C. R., Miller D. E., Rice D. W., Newton I. L., Hawley R. S., Teixeira L., Bergman C. M.** Dynamics of *Wolbachia pipientis* gene expression across the *Drosophila melanogaster* life cycle. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2015;5(12):2843–2856. DOI:

10.1534/g3.115.021931.

32. **Riegler M., Sidhu M., Miller W. J., O'Neill S. L.** Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*. 2005;15(15):1428–1433. DOI: 10.1016/j.cub.2005.06.069.
33. **Strunov A., Kirchner S., Schindelar J., Kruckenhauser L., Haring E., Kapun M.** Historic museum samples provide evidence for a recent replacement of *Wolbachia* types in European *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution*. 2023;40(12):msad258. DOI: 10.1093/molbev/msad258.
34. **Mazzucco R., Nolte V., Vijayan T., Schlötterer C.** Long-Term Dynamics Among *Wolbachia* Strains During Thermal Adaptation of Their *Drosophila melanogaster* Hosts. *Frontiers in Genetics*. 2020;11:482. DOI: 10.3389/fgene.2020.00482.
35. **Huang W., Massouras A., Inoue Y. та ін.** Natural variation in genome architecture among 205 *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel lines. *Genome Research*. 2014;24(7):1193–1208. DOI: 10.1101/gr.171546.113.
36. **Njogu A. K., Logozzo F., Conner W. R., Shropshire J. D.** Counting rare *Wolbachia* endosymbionts using digital droplet PCR. *Microbiology Spectrum*. 2025;13(6):e0326624. (preprint 2024-12-10 на bioRxiv). DOI: 10.1128/spectrum.03266-24.
37. **Strunov A., Schönherr C., Kapun M.** *Wolbachia* effects on thermal preference of natural *Drosophila melanogaster* are influenced by host genetic background, *Wolbachia* type, and bacterial titer. *Environmental*

38. **Padde J. R., Lu Q., Long Y. та ін.** The impact of environmental and host factors on *Wolbachia* density and efficacy as a biological tool. *Decoding Infection and Transmission*. 2023;1:100006. DOI: 10.1016/j.dcit.2023.100006.
39. **Team, R.C., R:** A Language and Environment for Statistical Computing, 2018.
40. **W. H. Kruskal & W. A. Wallis (1952).** *Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis*. Journal of the American Statistical Association, 47(260), 583–621.
41. **Hoskins M, Pearce J, Bethell A, et al.** *Pharmacotherapy for post-traumatic stress disorder: Systematic review and meta-analysis*. *British Journal of Psychiatry*. 2015;206(2):93-100. doi:10.1192/bjp.bp.114.148551
42. **Scholz, A. M., Kapun, M., Kofler, R., Vieira, J., & Bergman, C. M. (2023).** *Genome-scale analysis of Wolbachia infection dynamics in historic and contemporary Drosophila melanogaster populations*. *Molecular Biology and Evolution*, 40(8), msad159.
43. **Kapun, M., Barrón, M.G., Staubach, F., et al. (2020).** *A coalescent-based method for detecting spatial and temporal patterns of selection from pooled population genomic data*. *Molecular Ecology*, 29(16), 3151–3169.
44. **Spearman, C. (1904).** *The proof and measurement of association between two things*. *American Journal of Psychology*.
45. **Maistrenko O.M., Chan Yeong Kim, Nishijima S., Fullam A., et al.,** in preparation

АНОТАЦІЯ

Робота викладена на 69 сторінках друкованого тексту, містить 7 таблиць, 16 рисунків та 45 джерела літератури.

Дане дослідження присвячене оцінці відносного титру ендосимбіотичної бактерії *Wolbachia* у природних популяціях *Drosophila melanogaster* з різних географічних регіонів світу. Аналіз просторово-часової мінливості титру *Wolbachia* та виявлення чинників, що можуть впливати на його рівень, є важливими для розуміння екологічних і еволюційних взаємодій між хазяїном та ендосимбіонтом. Практичне значення роботи полягає у можливості використання отриманих результатів для інтерпретації популяційно-генетичних досліджень *D. melanogaster*, врахування впливу *Wolbachia* як прихованого фактору мінливості, а також для подальшого планування експериментів, спрямованих на вивчення ролі ендосимбіонтів у адаптації природних популяцій.

За результатами проведеного дослідження було проаналізовано дані повногеномного секвенування природних популяцій *D. melanogaster*, отримані в межах міжнародного проєкту DEST 2.0. Показано, що титр *Wolbachia* характеризується асиметричним розподілом із переважанням низьких значень та наявністю зразків без ознак інфікованості. Виявлено статистично значущий зв'язок між рівнем титру *Wolbachia* та географічною широтою, а також істотні відмінності між континентами, тоді як вплив довготи не був значущим. Не встановлено чітких сезонних закономірностей зміни титру бактерії. Аналіз кліматичних факторів показав, що поєднання просторових та абіотичних змінних краще пояснює варіацію титру, ніж використання лише кліматичних параметрів. Встановлено, що включення біотичних чинників, зокрема показників наявності окремих таксонів грибів,

істотно покращує пояснювальну здатність статистичних моделей, що свідчить про можливі асоціації між мікробними компонентами середовища та рівнем *Wolbachia* у популяціях хазяїна.

Ключові слова: *Drosophila melanogaster*, *Wolbachia*, природні популяції, відносний титр, географічна мінливість, кліматичні фактори, біотичні взаємодії.

Annotation

This study is devoted to the assessment of the relative titer of the endosymbiotic bacterium *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila melanogaster* from different geographic regions of the world. The analysis of the spatial and temporal variability of *Wolbachia* titer and the identification of factors that may influence its level are important for understanding ecological and evolutionary interactions between the host and the endosymbiont. The practical significance of this work lies in the possibility of using the obtained results for the interpretation of population genetic studies of *D. melanogaster*, taking into account the influence of *Wolbachia* as a hidden source of variation, as well as for further planning of experiments aimed at investigating the role of endosymbionts in the adaptation of natural populations.

According to the results of the study, whole-genome sequencing data of natural populations of *D. melanogaster* obtained within the framework of the international DEST 2.0 project were analyzed. It was shown that the *Wolbachia* titer is characterized by an asymmetric distribution with a predominance of low values and the presence of samples with no signs of infection. A statistically significant association between *Wolbachia* titer and geographic latitude was identified, as well as substantial differences among continents, whereas the effect of longitude was not significant. No clear seasonal patterns in changes of bacterial titer were detected. The analysis of climatic factors demonstrated that a combination of spatial and abiotic variables explains the variation in titer better than the use of climatic parameters alone. It was also established that the inclusion of biotic factors, in particular indicators of the presence of certain fungal taxa, significantly improves the explanatory power of statistical models, indicating possible associations between microbial components of the environment and *Wolbachia* levels in host populations.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, *Wolbachia*, natural populations, relative titer, geographic variation, climatic factors, biotic interactions.