DOI: 10.34617/kr48-9067
УДК 574.2

ФИЛОГЕНЕТИКА ДЕНСОВИРУСОВ НАСЕКОМЫХ

Зимин Андрей Антонович[1], канд. биол. наук
Скобликов Николай Эдуардович[2], канд. мед. наук
Ян Цунги [3], PhD Biol. Sci.
Карманова Александра Николаевна[1]
Осепчук Денис Васильевич[2,6], д-р с.-х. наук
Дроздов Анатолий Леонидович[4], д-р биол. наук
Назипова Нафиса Наиловна[5], канд. физ.-мат. наук
[1]*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,*
г. Пущино, Российская Федерация
[2]*ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии»,*
г. Краснодар, Российская Федерация
[3]*Школа наук о жизни, Университет Тайчжоу, Тайчжоу, Ченжзянь, Китай*
[4]*Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского, г. Владивосток, Российская Федерация*
[5]*Институт математических проблем биологии РАН – филиал Института прикладнойматематики им. М.В. Келдыша РАН, г. Пущино, Российская Федерация*
[6]*ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина», г. Краснодар, Российская Федерация*

В данной работе исследовано эволюционное сходство денсовирусов ряда насекомых и других животных для определения эволюционного положения денсовирусов тутового шелкопряда. *Densovirinae* – это подсемейство семейства *Parvoviridae*. *Parvoviridae* – это паразиты человека, сельскохозяйственных животных, многих членистоногих, включая виды, существенные для сельского хозяйства, ряда иглокожих. Парвовирусы, и денсовирусы в частности, возможные паразиты с перспективой расширения круга хозяев. Данная работа посвящена эволюционной экологии их геномов. В данном биоинформатическом исследовании денсовирусов показано, что эволюция их штаммов определяется не только специфичностью к таксономическому положению хозяина, но и местообитанию организма хозяина, то есть к его экологической группе.

Ключевые слова: *Densovirinae*, *Parvoviridae*; насекомые паразиты сельскохозяйственных культур; *Bombyx mori*

INSECTA DENSOVIRUS PHYLOGENETICS

Zimin Andrei Antonovich[1], PhD Biol. Sci.
Skoblikow Nikolay Edvardovich[2], PhD Med. Sci.
Yang Zhongyi[3], PhD Biol. Sci.
Karmanova Aleksandra Nikolaevna[1]
Osepchuk Denis Vasilyevich[2], Dr. Agr. Sci.
Drozdov Anatoly Leonidovich[4], Dr. Biol. Sci.
Nazipova Nafisa Nailovna[5], PhD Phys.-Math. Sci.

[1]*G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS - a separate subdivision of the Federal Research Center «Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences», Pushchino, Russian Federation*
[2]*Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russian Federation*
[3]*School of Life Sciences, Taizhou University, Taizhou, Zhejiang, China*
[4]*A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Vladivostok, Russian Federation*
[5]*Institute of Mathematical Problems of Biology RAS – the Branch of Keldysh Institute of Applied Mathematics of Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation*
[6]*Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russian Federation*

In this paper, we studied the evolutionary similarity of insect densoviruses to determine the evolutionary position of silkworm dense viruses. *Densovirinae* are a subfamily among the *Parvoviridae* family. Parvoviruses are parasites of human, farm animals, many arthropods, including agricultural species, and a number of echinoderms. Parvoviruses and densoviruses, in particular possible parasites with the expansion of the host circle. *Densovirinae* carry single-stranded DNA, but their mutation rate is similar to the mutation frequency of virus RNA. This work is devoted to the evolutionary ecology of their genomes. In the bioinformatic study of densoviruses, it was shown that the evolution of their strains is due not only to specificity for the taxonomic position of the host, but also to the habitat of the host organism.

Key words: densoviruses; parvoviruses; insects' parasites of farm animals; *Bombyx mori*

Вирусы подсемейства *Densovirinae* имеют существенное значение в сельском хозяйстве. Они заражают насекомых, которые являются вредителями различных сельскохозяйственных растений, и эти вирусы используются для борьбы с ними. Денсовирусы комаров и москитов используются для уничтожения этих переносчиков паразитов человека и сельскохозяйственных животных. Нельзя исключить расширение круга хозяев этих вирусов и выход их из-под контроля человека, что несет перспективы определенного беспокойства. В число видов, инфицируемых этими вирусами, входят различные животные, используемые человеком: объекты марикультуры – морские ежи и морские огурцы, кукумария, креветки и такие насекомые, как шмели, пчелы, тутовые шелкопряды. Шелководство является той областью сельского хозяйства, где мелкий и средний бизнес на базе фермерских образований может быть весьма успешным, а Краснодарский край является тем регионом, где для этого существуют благоприятные климатические и социальные условия, опирающиеся на существующие традиции – в советское время в этом регионе существовала и работала данная область сельского хозяйства. Развитие современного шелководства на Юге России требует изучения болезней тутового шелкопряда. Развитие современного шелководства должно осуществляться с применением методов молекулярной биологии и биоинфоматики.

С эволюционной точки зрения структурные белки мелких вирусов могут содержать последовательности, являющиеся следами происхождения и эволюции первых вирусов. Филогенетический анализ этих белков может дать представление о современной эволюции и изменчивости этих белков. Данные сведения могут помочь в корректном последующем выявлении основных консервативных мотивов этих белков. Одновременно такой анализ – это путь создания нового инструментария для понимания и преодоления денсовирусной и парвовирусной инфекции самых различных животных, а также человека.

Полученные знания могут объяснить происхождение того или иного штамма вируса у конкретного вида животных. Эти сведения могут быть использованы для разработки подходов для ПЦР-детекции результатов применения

Densovirinae в агрономии. Одновременно, задача по анализу эволюции этой группы корпускулярных форм жизни с большими различиями в длине геномов может оказаться существенной при решении задач по исследованию путей происхождения и ранних этапов эволюции жизни. Необходимо также учесть, что это вирусы, хозяевами которых являются насекомые. На земле обитает, по крайней мере, 10^7 представителей таксона Insecta. По нашему мнению, Densovirinae могут быть оптимальной системой для палеонтологических исследований среди существующих в данный момент времени вирусов.

Биоинформатическое исследование было направлено наследующие задачи.

1) Выявить близость ряда денсовирусов насекомых и создать задел для биоинформатических палеонтологических исследований.

2) Провести анализ полученных филогенетических деревьев с точки зрения эволюционных сходств гомологичных белков денсовирусов и экологических групп гомологов, заражающих насекомых и других беспозвоночных.

3) Определить местоположение денсовирусов тутового шелкопряда на полученных деревьях.

Методика исследований. Нами было построено два филогенетических дерева Densovirinae, отражающих близость представителей денсовирусов членистоногих с различными группами хозяев. Для построения филогенетических эволюционных деревьев было использовано два разных подхода.

В основу первого дерева (рис. 1) легли структурные белки денсовирусов насекомых. Маркерным белком выступил структурный белок денсовируса морской звезды – SsaDV [1]. После четвертой итерации программы сравнения PSI-BLAST [4] было найдено 87 гомологов при значении E < 3e-29. Для анализа филогении с помощью пакета программ Mega6 [3] был использован статистический метод UPGMA. Для филогенетического теста использовался Bootstrap method [6].

В основу второго дерева легли последовательности полных геномов вирусов (рис. 2). Эволюционная история была выведена с использованием метода минимальной эволюции [5]. Построение дерева было проведено с помощью пакета программ MEGA6 [5]. В итоге было получено оптимальное дерево с суммой длины ветвей 14,79909545. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода максимального составного правдоподобия [5] и выражены в единицах количества базовых замен на сайт. Анализ включал 50 нуклеотидных последовательностей полных геномов Densovirinae.

Результаты исследований и их обсуждение. Для начала обсудим результаты первого дерева (рис. 1). Ранее мы использовали ряд методов для построения этого дерева и анализа устойчивости его ветвления. В этой работе мы остановились на вопросе укоренения дерева. Попытки укоренения дерева с помощью использования гомологов из группы парвовирусов человека, гуся и свиньи не дали результата (черные квадраты). Эти белки располагались в центре радиации при использовании, как метода максимального правдоподобия, так и других подходов. Было решено использовать сильно удаленную последовательность, но имеющую гомологию с структурными белками парвовирусов. Среди РНК-вирусов была найдена последовательность белка слияния авуловируса птиц (*Avian avulavirus*) (кольцо). Дерево, полученное нами в данной работе, имеет укоренение, так как последовательности авуловируса и денсовируса, как ни удивительно, растения *Brachypodium distachyon* (треугольник, вершиной вниз) располагаются на отдельной ветви внутри дерева. Корень располагается между этими двумя ветвями. Белки вирусов различных чещуекрылых (черные кружки) разнесены на две родственные внутри, но сильно

удаленные друг от друга группы последовательностей. Это говорит о том, что данные вирусы однозначно тяготеют к распространению на родственные виды членистоногих, но могут заражать и не родственные исходному хозяину виды. Расположение близко друг к другу белков вирусов морских звезд (ромб) и австралийского водного рака (треугольник вверх вершиной) может говорить о экологическом факторе в приобретении новых хозяев.

Результаты второго дерева не менее интересны (рисунок 2). Денсовирусы чешуекрылых также распадаются на две, удаленные ветви. Вирусы двукрылых и креветок находятся на общей ветви и довольно близко друг к другу. Вирусы многих видов насекомых не группируются в соответствии с таксономией хозяев. По результатам данной работы филогенетическая близость вирусов креветок и ряда вирусов двукрылых может говорить о наличии перекрытия круга хозяев для этой группы штаммов Densovirinae.

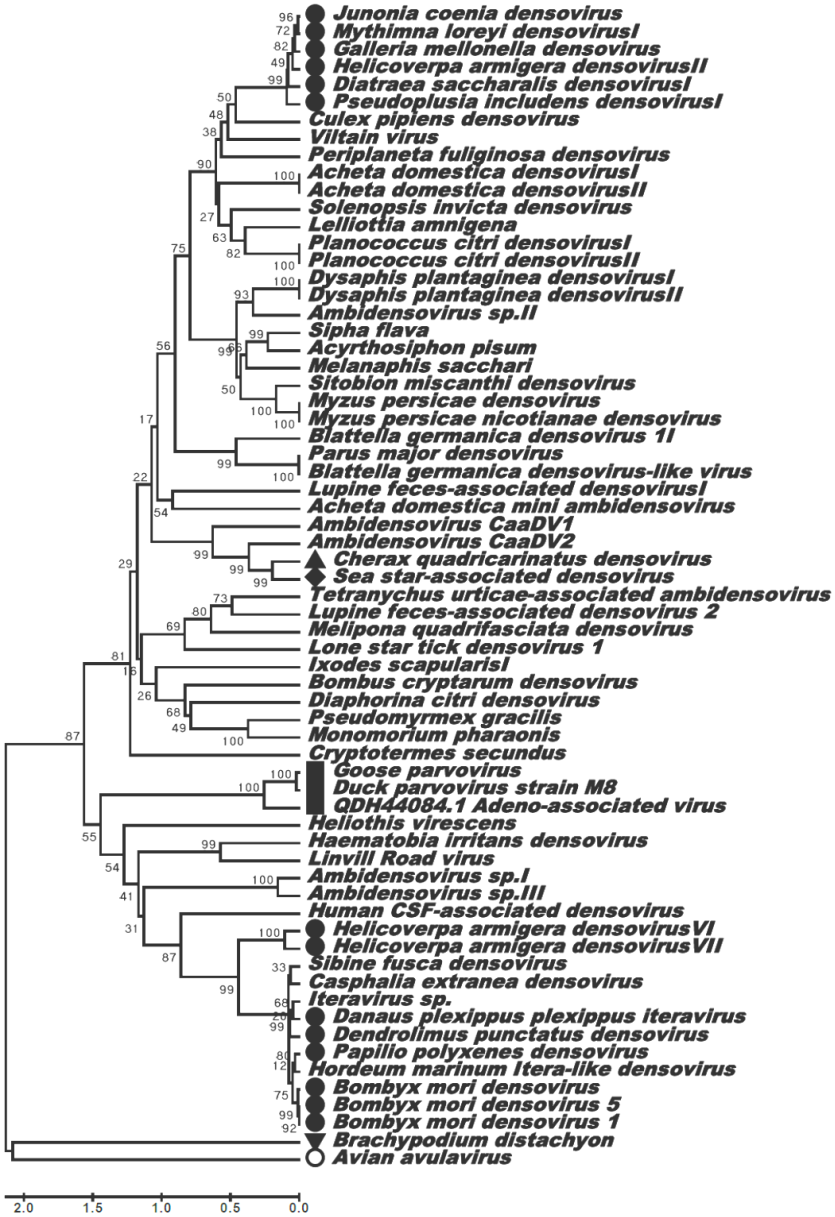

Рисунок 1 – Молекулярно-филогенетический анализ гомологов структурного белка денсовируса морских звезд методом Maximum Likelihood, основанного на мат-

ричной модели JTT [12]. Статистический анализ проведен путем 1000 итераций [11]. На рисунке показано дерево с самым высоким логарифмическим правдоподобием (-11578,0225). Ветви, в которые связанные таксоны сгруппированы вместе, статистически оценены в процентах устойчивости при «бутстрап-анализе». Исходное дерево было получено с использованием метода Maximum Parsimony. Длина ветвей измеряется числом замен на сайт. В анализе были использованы 62 белка. Анализ был проведен в MEGA6 [9]. А.к. последовательность белка денсорвируса, SsaDV, морских звезд отмечена ромбом, вируса рака – треугольником, белки из вирусов *Lepidoptera* – кружками, белки парвовирусов позвоночных – квадратами.

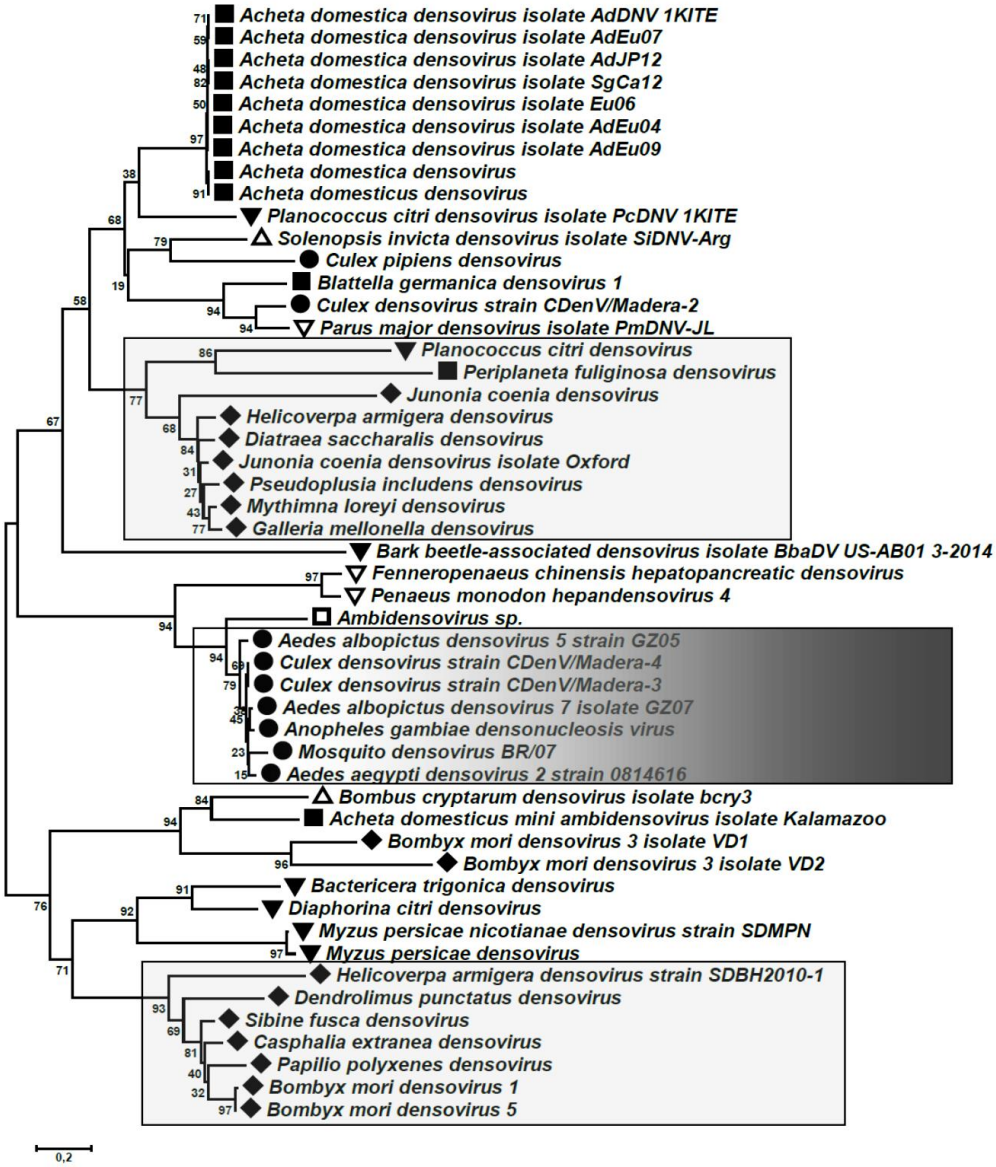

Рисунок 2 – Филогеномное дерево Densovirinae. Кружком отмечены геномы денсовирусов видов отряда Diptera, ромбом – Lepidoptera, незаполненным треугольником вершиной вверх – Hymenoptera, треугольником вершиной вниз – Hemiptera, вирусы других животных – незаполненным треугольником вершиной вниз, незаполненным квадратом – амбиденсовирус. В рамки обведены две ветви с вирусами Lepidoptera; рамка, отмеченная серой волной, содержит ветвь геномов вирусов Diptera – переносчиков паразитарных простейших и вирусов человека.

Заключение. Эволюция парвовирусов, в том числе денсовирусов является достаточно быстрым процессом, что позволяет этим живым сущностям быстро завоевывать новые экологические ниши [6,7]. По этим причинам использование белка VP3 вируса для филогенетического анализа весьма ограничено. Этот белок испытывает большую ко-эволюционную нагрузку при расширении круга хозяев конкретного штамма денсовируса и необходимости узнавания рецепторов на поверхности клеток нового хозяина. Эволюционный анализ при таком исследовании может отражать в первую очередь экологические связи между кластеризующимися группами вирусов. Для филогенетической таксономии штаммов данной группы вирусов, вероятно, следует использовать анализ эволюционных связей как этого белка, так и неструктурного белка, а также сравнение фрагментов геномных последовательностей. С другой стороны, проведенный нами анализ показывает возможность его использования для определения пути распространения штаммов денсовирусов в природе.

Выводы. 1. Оба анализа показали, что, несмотря на формирование общих отдельных ветвей для вирусов таксономически родственных хозяев, наблюдается разделение вирусов родственных хозяев на удаленные на дереве группы.

2. Денсовирусы тутового шелкопряда также на филогеномном дереве разделены на весьма удаленные ветви.

3. На филогенетическом дереве структурных белков денсовирусов наблюдается формирование экологической группы (ветви), в которую входят белок вируса австралийского рака и структурный белок вируса морской звезды. Подобную группу можно предположительно выявить и на дереве геномов. Это геномы антропоморфной большой синицы, комара и таракана. Все эти животные связаны с человеком.

4. Проведенные нами анализы показывают возможность их использования для определения пути распространения штаммов Densovirinae в природе

Исследование для Зимина А.А. было частично поддержано бюджетом ИБФМ РАН и частично поддержано для него же грантом РФФИ №20-54-53018 ГФЕН_а и выполнено им в рамках этого проекта, для Скобликова Н.Э. частично поддержано РФФИ и администрацией Краснодарского края и выполнено им в рамках гранта №19-44-230040-р_а, для Назиповой Н.Н. поддержано грантом РФФИ №19-07-00996_а.

Список литературы

1. Hewson, I. Densovirus associated with sea-star wasting / I. Hewson // PNAS 2014.111 (48);17278-83.

2. Altschul S.F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs / S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman // Nucleic Acids Res. 1997. 25; 3389-3402.

3. Tamura K. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar // 2013. 30; 2725-2729.

4. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution. 1985. 39; 783-791.

5. Jones D.T. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Computer Applications in the Biosciences / D.T. Jones, W.R. Taylor, J.M. Thornton. 1992. 8; 275-282.

6. Shackelton L.A. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus / L.A. Shackelton, C.R. Parrish, U. Truyen, E.C. Holmes // PNAS USA. 2005. Jan 11; 102(2): 379-84.

7. Shackelton L.A., Holmes E.C. Phylogenetic evidence for the rapid evolution of human B19 erythrovirus. J Virol. / L.A. Shackelton, E.C. Holmes //2006. Apr; 80(7): 3666-9.