

лодняку крупного рогатого скота).

### Список литературы

1. Бельков, Г.И. Мясная продуктивность бычков-кастратов казахской белоголовой породы и эффективность производства говядины при различных системах нагула и откорма / Г.И. Бельков // Животноводство и кормопроизводство. – 2018. – Т. 101. – № 4. – С. 123-128.
2. Третьякова, Р.Ф. Сравнительная морфофункциональная характеристика длиннейшей мышцы спины бычков-кастратов двух породных типов (айта и вознесенский) калмыцкой породы крупного рогатого скота / Р.Ф. Третьякова, Н.Н. Шевлюк // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2018. – № 6 (74). – С. 185-187.
3. Шляхтунов, В.И. Возрастные изменения весового роста мышц осевого отдела скелета у бычков, кастратов и телок / В.И. Шляхтунов, А.И. Плященко // Тр. Белорусского. НИИ животноводства. – 1978. – Т. 19. – С. 20-24.
4. Campo, M.M. Assessment of breed type and ageing time effects on beef meat quality using two different texture devices / Campo M.M., Santolaria P., Sacudo C., Lepetit J., Olleta J.L., Panea B., Alberti P. // Meat Science. – 2000. – Vol. 55. – Pp. 371-378.
5. Cheong, J.K. Effects of geographic locations and year-seasons of birth on ultrasound scanned measures and carcass traits of Hanwoo steers / J.K. Cheong, Y.T. Oh, H.N. Choi, C.H. Lee [et al.] // J Anim. Sci. Technol. – 2012. – V. 54 (2). – Pp. 47-52.
6. Mironova, I. V. Productive qualities of bulls and castrates of the black-and-white breed and its crossbreeds with the Salers breed Izvestiya / I. V. Mironova, D. R. Gilmanov // Orenburg state agrarian University – 2013. – 4 (42). ID: 20214161. – Pp. – 107-110.
7. Rodriguez, J. Carcass and meat quality characteristics of Brahman cross bulls and steers finished on tropical pastures in Costa Rica / J. Rodriguez, J. Unruh, M. Villarreal-Castro, O. Murillo // Meat Science. – 2013. – V. 96 (3). – Pp. 1340-1344. DOI: 10.1016/j.meatsci.2013.10.024.
8. Tagirov, N. Meat qualities and biological features of bulls and castrates of different origin / N.Tagirov // Chief zootechnician. – 2012. – № 9. Pp. – 32-40.
9. H. Lim, J.S. Ahn, J.M. Kim, G.H. Son et al., Journal of Anim. Sci. and Tech. – 2018. – 60 p.
10. Becker, J. Bruckmaier et al. / J. Becker, M.G. Doherr, R.M. // The Veterinary Journal. – 2012. – Pp. 380-385.

DOI 10.48612/sbornik-2022-2-14

УДК 574.24

### ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДЕНСОВИРУСОВ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ CLINCH ВИРУСУ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ ОТРЯДА UNIONIDA

**Зимин Андрей Антонович**<sup>1</sup>, канд. биол. наук

**Карманова Александра Николаевна**<sup>1,2</sup>

**Осепчук Денис Васильевич**<sup>3,4</sup>, д-р с-х. наук

**Лу И.**<sup>5</sup>, PhD Biol. Sci.

**Никулин Никита Алексеевич**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пушкино, Российская Федерация

<sup>2</sup>Пушчинский государственный естественно-научный институт,

г. Пушкино, Российская Федерация,

<sup>3</sup>ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии»,

г. Краснодар, Российская Федерация,

<sup>4</sup>ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина»,

г. Краснодар, Российская Федерация

<sup>5</sup>College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai, China

Проведен эволюционный UPGMA-анализ структурного белка VP4 Clinch вируса двустворчатых моллюсков. Наиболее близким белком оказался структурный белок денсовируса дымчато-коричневого таракана (*Periplaneta fuliginosa*) и амбиденсовирусов ряда воробьинообразных (*Passeriformes*) птиц. На основе данных о широком распространении членистоногого *Periplaneta fuliginosa* и филогенетического анализа можно предположить, что распространение гена этого белка происходит, как за счет распространения самого денсовируса, так и горизонтального переноса самого гена от денсовирусов к амбиденсовирусам, предположительно опосредованного паразитическими членистоногими. Массовая гибель двустворчатых моллюсков в реке Клинч в США может быть связана с недавним переходом этого денсовируса от таракана к моллюскам и по этой причине отсутствием устойчивых к денсовирусу форм у видов *Bivalvia*.

**Ключевые слова:** *Bivalves; Mollusca; Virus; Unionidae*; инфекции животных; пресноводные моллюски; *Clinch* вирус

## PHYLOGENETIC ANALYSIS OF DENSOVIRUSES CLOSELY RELATED TO CLINCH BIVALVE MOLLUSC VIRUS OF THE *UNIONIDA* CLASS

Zimin Andrei Antonovich<sup>1</sup>, PhD Biol. Sci.

Karmanova Aleksandra Nikolaevna<sup>1, 2</sup>

Osepchuk Denis Vasilyevich<sup>3, 4</sup>, Dr. Agr. Sci.

Lu Yinhua<sup>5</sup>, PhD Biol. Sci.

Nikulin Nikita Alekseevich<sup>1</sup>

<sup>1</sup>G.K. Scriabin 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

<sup>2</sup>Pushchino State Institute of Natural Science, Pushchino, Russian Federation

<sup>3</sup>Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russian Federation

<sup>4</sup>Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russian Federation

<sup>5</sup>College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai, China

An evolutionary UPGMA analysis of the structural protein VP4 Clinch of the bivalve mollusk virus was carried out. The closest protein was the structural protein of the smoky-brown cockroach densovirus, *Periplaneta fuliginosa*, and the ambidensovirus of a number of passeriformes (*Passeriformes*) birds. Based on data on the wide distribution of the arthropod *Periplaneta fuliginosa* and phylogenetic analysis, it can be assumed that the spread of the gene for this protein occurs both due to the spread of the densovirus itself and the horizontal transfer of the gene itself from densovirus to ambidensovirus, presumably mediated by parasitic arthropods. Mass mortality of bivalves in the Clinch River in the United States may be re-

lated to the recent transfer of this densovirus from cockroach to molluscs and, therefore, the absence of densovirus-resistant forms in the *Bivalvia* species.

**Key words:** *Bivalves; Molluscs; Virus; Unionidae*; freshwater mussels; animal disease; *Clinch virus*

Пресноводные двустворчатые моллюски *Unionida* представляют собой группу повсеместно распространенных моллюсков, живущих как в небольших канавах и прудах, так и больших озерах, реках. Изучение двустворчатых моллюсков представляет особый интерес для решения вопросов не только в области экологии, но и биотехнологий, в том числе применяемых в сельском хозяйстве.

Представители таксона *Unionida* часто используются в качестве живых тест-систем в экотоксикологических исследованиях. Это связано с образом жизни животных. Двустворчатые моллюски питаются бактериями, водорослями, детритом, фито- и зоопланктоном. Они удаляют взвешенные твердые частицы из водной массы и промежуточных пространств в донном субстрате путем фильтрации. В периоды низкого летнего стока малых рек сообщества мидий способны рециркулировать воду, что приводит к многократным циклам фильтрации. Данные характеристики способны оказывать сильное влияние на все процессы пресноводной экосистемы. Помимо прочего, двустворчатые моллюски способны отфильтровывать некоторые химические вещества из воды, что делает из них отличных биоиндикаторов антропогенных загрязнений водоемов. Также, благодаря способности к фильтрации, двустворчатые моллюски могут накапливать патогенные вирусы и бактерии, что в некоторых случаях учитывается в санитарно-эпидемиологическом контроле водных пространств.

Хотя двустворчатые моллюски отряда *Unionida* отличаются очень большим биоразнообразием, ряд их таксонов находится под угрозой исчезновения. В последние десятилетия в мире наблюдалось несколько примеров массовой гибели этих животных. Например, в Северной

Америке 298 признанных видов юнионид (т.е. >70%) считаются находящимися под угрозой исчезновения или уязвимыми. Только в юго-восточной части Соединенных Штатов вымерло 23 вида.

Привело к этому несколько факторов. Во-первых, это разрушение естественной среды обитания, например, загрязнение и осушение водных пространств, водохранилищ, озер и т.п. Во-вторых, чрезмерный вылов моллюсков для коммерческого использования: сбор жемчуга, раковин для производства пуговиц и т.п., что в течение предыдущих столетий привело к значительному снижению численности местных *Unionida sp.* В свою очередь это повысило конкуренцию за освобождающиеся ниши со стороны инвазивных видов. Например, азиатский моллюск *Corbicula fuminea*, мидия-зебра *Dreissena polymorpha* и мидия-квагга *D. Bugensis* значительно сократили или истребили многих местных видов мидий. Эти угрозы существуют с начала двадцатого века, отражая тенденции развития человека и Земли [1] - [3].

Третья причина, не менее значимая, однако менее изученная, связана с летальностью от вирусной инфекции двустворчатых моллюсков. В одном исследовании были изучены мидии в Клинч-Ривер (Вирджиния и Теннесси, США) где численность эндемичных и когда-то преобладающих *Actinonaias pectorosa* резко сократилась примерно с 2016 года [3]. Авторы исследования массовой гибели двустворчатых моллюсков идентифицировали 17 новых вирусов в панцирях *Unionida sp* реки Клинч в США [3]. Однако только один вирус, новый денсовирус (*Parvoviridae; Densovirinae*), был эпидемиологически связан с заболеваемостью и массовым летальным исходом большинства двустворок. Вероятность обна-

ружения денсовируса 1 реки Клинч у больных умирающих двустворок была в 11,2 раза выше, чем у контрольной группы. Очевидно, здоровые двустворки с одного и того же или совпадающих участков встречались там существенно реже, а количество случаев гибели этих моллюсков было в 2,7 раз выше, чем в контроле [3].

Многие денсовирусы вызывают смертельные эпидемические заболевания беспозвоночных, в т.ч. заболевания креветок, тараканов, сверчков, многих видов ночных разноусых бабочек, раков и массовую гибель у морских звезд, так называемую болезнь "плавления морских звезд" [1-3]. Денсовирусная инфекция требует внимания как фактор массовой гибели представителей отряда *Unionida* либо как прямая причина, либо как косвенное следствие физиологических факторов, взаимодействующий с другими биологическими и экологическими стресс-эффектами, способными ускорить смертность у этих моллюсков. Пресноводные двустворчатые моллюски *Unionida* являются важными представителями пресноводных биоценозов, обеспечивая экосистему как фильтрацией воды, так и круговоротом питательных веществ. Они в пресноводных водоемах ответственны за стабилизацию физической среды обитания для других организмов и являются одним из ключевых участников пищевых сетей этих биомов. Выпадение из биоценоза этих моллюсков может привести к серьезным экологическим изменениям, их исчезновение может привести к катастрофическим последствиям для всех экосистем Земли.

В связи с этим, изучение денсовирусов и денсовирусных инфекций крайне важны для предотвращения гибели двустворчатых моллюсков, в том числе представителей, используемых в сельском хозяйстве для продукции жемчуга и других значимых ресурсов. В этой статье мы представляем филогенетический анализ вирусов близкородственных Clinch River - вирусу двустворчатых моллюсков отряда

*Unionida*, который вызвал массовую гибель этих моллюсков в США.

**Методика исследований.** При помощи алгоритмов BLAST среди аминокислотных последовательностей базы данных nr (non-redundant protein sequences) были отобраны белки, являющиеся наиболее близкими гомологами структурного белка VP4 Clinch вируса. Было проведено сравнение последовательностей и их множественное выравнивание алгоритмом MUSCLE и в дальнейшем построение дерева методами UPGMA (рис. 1) [4] и Maximum Parsimony (рис. 2) [5]. Для UPGMA использовалась Jones-Taylor-Thornton (JTT) модель аминокислотных замен, зависящая от контекста. Эволюционные расстояния были выражены в единицах количества аминокислотных замен на сайт [6]. В этом анализе использовали 21 аминокислотную последовательность. Все позиции, содержащие гэпы и отсутствующие данные, были устранены (опция полного удаления). Всего в финальном наборе данных было 396 позиций. Для Maximum Parsimony использовали модель Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) с уровнем поиска 1, в котором исходные деревья были получены путем случайного добавления последовательностей (10 повторов) [5]. В этом анализе участвовала 21 аминокислотная последовательность. Все позиции, содержащие пробелы и отсутствующие данные, были устранены (опция полного удаления). Всего в финальном наборе данных было 396 позиций. Эволюционный анализ для обоих деревьев проводился в MEGA X [7].

**Результаты исследований и их обсуждение.** Согласно филогенетическому UPGMA-анализу структурного белка VP4 вирус из реки Клинча оказался наиболее близким к денсовирусу дымчатокоричневого таракана (*Periplaneta fuliginosa*), который распространен во всем мире. На общей с этими последовательностями ветви структурных белков располагаются последовательности белков амбиденсовирусов птиц, таких как

пеночка-зарничка (*Phylloscopus inornatus*), черногорлая овсянка (*Emberiza tristrami*), обычный мелкий представитель орнитофауны смешанных лесов средней полосы европейской части России - москковка (*Periparus ater*) и широко распространенная в Евразии, но почти не встречающаяся в европейской части России мухоловка - синехвостка (*Tarsiger cyanurus*), обитатель влажных чащ густых хвойных лесов. Данное распределение на филогенетическом дереве структурных белков денсовирусов и амбиденсовирусов наводит на мысль об общем происхождении данной группы вирусов, либо о горизонтальном переносе генов этих структурных белков по следующей схеме: исходный хозяин предковой формы - членистоногое, следующий хозяин - таракан, который оказался приспособленным к широкому кругу биотопов. Тем самым таракан мог передать вирус или в некоторых случаях ген структурного белка прямым путем - в случае попадания зараженного таракана в водоем и как следствие передачи денсовируса моллюску, обладающему питанием за счет фильтрации воды. Опосредованно также через паразитических членистоногих мог происходить обмен генами родственных вирусов и появление этого гена у амбиденсовирусов птиц. Ареал *Periparus ater* – это континент Евразия без крайних северных и крайних южных районов. Вероятность получения этого гена у вирусов, хозяином которых является данный вид, естественно, выше. На филогенетическом дереве мы видим подтверждение этого из-за эволюционной близости последовательностей из вирусов москковки и таракана.

Филогенетический анализ белков денсовирусов и амбиденсовирусов гомологов VP4 Clinch вируса методом Maximum Parsimony подтвердил данные полученные при помощи UPGMA-анализе.

Черными кружками обозначены белки амбиденсовирусов позвоночных животных, в основном птиц, пеночки-зарнички (*Phylloscopus inornatus*), даурской ласточки (*Cecropis daurica*), синицы-москвки (*Periparus ater*), черногорлой овсянки (*Emberiza tristrami*), синехвостки (*Tarsiger cyanurus*), и других. Белыми ромбами обозначены денсовирусы членистоногих, в основном насекомых. Черными треугольниками обозначены денсовирусы, ассоциированные с летучими мышами. Эти денсовирусы вряд ли инфицируют летучих мышей. Денсовирусные инфекции позвоночных пока не обнаружены.

Скорее данные денсовирусы размножаются на каких-либо членистоногих-паразитах летучих мышей, например, на клещах. Белым кружком обозначена аминокислотная последовательность ассоциированная с *Lelliottia amnigena* densovirus. Ранее мы показали, что для денсовирусов более характерны эволюционные связи по экологическим причинам, чем определяемые биологическим родством хозяев [9]. В данном случае также возможна подобная ситуация. Эта ситуация может быть, например, связана с существенной независимостью внутриклеточного развития этих вирусов от метаболизма хозяина и проникновением в клетку за счет взаимодействия с липидами, а не белками в качестве рецепторов.

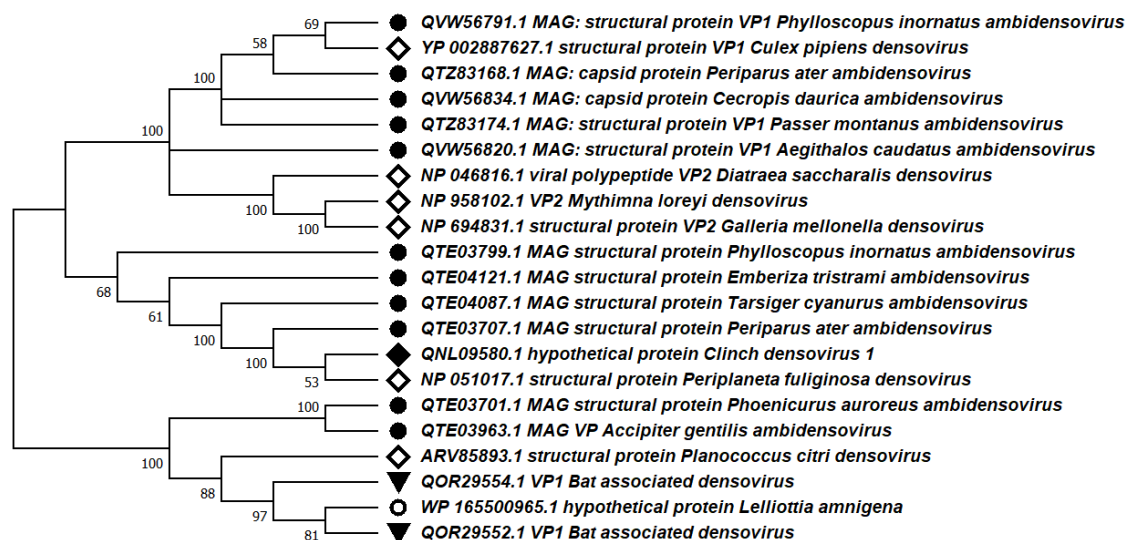


Рисунок 1 – Филогенетическое дерево структурного белка VP4 вируса двустворчатых моллюсков реки Клинка, построенное методом UPGMA. Эволюционная история выводилась с использованием метода UPGMA [4]. Консенсусное дерево начальной загрузки, полученное из 1000 повторов [8], взято для представления эволюционной истории анализируемых таксонов [8]. Ветви, соответствующие разделам, воспроизведенным менее чем в 50 % репликах начальной загрузки, удалены. Рядом с ветвями показан процент повторяющихся деревьев, в которых связанные таксоны сгруппированы вместе в тесте начальной загрузки (1000 повторов) [8]

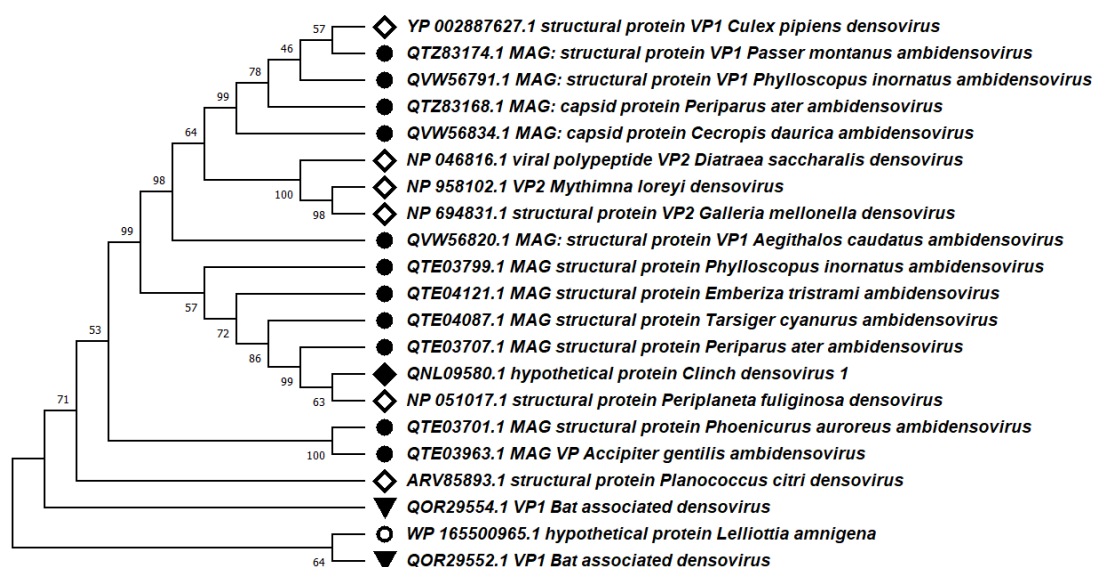


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево структурного белка VP4 вируса двустворчатых моллюсков реки Клинка построенное методом Maximum Parsimony. Показано самое экономичное дерево длиной = 2827. Индекс согласованности (0,665948), индекс удержания (0,566293) и составной индекс 0,380200 (0,377122) для всех сайтов и сайтов с экономной информацией (в скобках). Рядом с ветвями показан процент повторяющихся деревьев, в которых ассоциированные таксоны сгруппированы вместе в бутстреп-тесте (1000 повторов) [8]. Вирус Клинка сгруппирован на одной ветви этим методом с теми же последовательностями, что и при UPGMA-анализе. Описание обозначений на дереве совпадает с описанием на рисунке.1.

**Выводы.** Эволюционные UPGMA и Maximum Parsimony анализы структурного белка VP4 вируса двустворчатых моллюсков реки Клинча оказался наиболее близким к денсовирусу дымчатокоричневого таракана (*Periplaneta fuliginosa*) и амбиденсовирусам ряда воробьинообразных (*Passeriformes*) птиц. На основе данных о широком распространении членистоногого *Periplaneta fuliginosa* и филогенетического анализа можно предположить, что распространение гена этого белка происходит, как за счет распространения самого денсовируса, в случае моллюска, так и горизонтального переноса самого гена от денсовирусов к амбиденсовирусам, предположительно опосредованного паразитическими членистоногими (например, клещами птиц). В связи с этим, мы предполагаем, что массовая гибель двустворчатых моллюсков в реке Клинч в США может быть связана с недавним переходом этого денсовируса от таракана к моллюскам и по этой причине отсутствием устойчивых к денсовирусу форм у представителей *Bivalvia*.

**Благодарности.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00669, <https://rscf.ru/project/22-25-00669/>

### Список литературы

1. Renault T. Viruses infecting bivalve molluscs / Renault T., Novoa B. // *Aquat. Living Resour.* 2004. 17; 4; 397-409  
2. Carella F. Disease and Disorders of Freshwater Unionid Mussels: A Brief Over-

view of Recent Studies / Carella F., Villari G., Maio N., De Vico G. // *Front. Physiol.* 2016. 7:489. doi:10.3389/fphys.2016.00489

3. Richard, J.C. Mass mortality in freshwater mussels (*Actinonaias pectorosa*) in the Clinch River, USA, linked to a novel densovirus / Richard, J.C., Leis, E., Dunn, C.D. et al // *Sci Rep* 2020. 10; 14498 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71459-z>

4. Sneath P.H.A., Sokal R.R. (1973). *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.

5. Nei M. and Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. 2000. Oxford University Press, New York.

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

7. Kumar S. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, K. Tamura // *Molecular Biology and Evolution* 2018. 35:1547-1549.

8. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap / Felsenstein J. // *Evolution* 1985. 39:783-791.

9. Зимин А.А. Филогенетика денсовирусов насекомых / Зимин А.А., Скобликов Н.Э., Ян Цунги, Карманова А.Н., Осепчук Д.В., Дроздов А.Л., Назипова Н.Н. // *Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии* // 2020. - Т. 9. - № 2. С. 56 - 61. DOI: 10.34617/kr48-9067