

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Коноров Евгений Андреевич

**Изучение адаптации и преадаптации муравьев *Lasius niger* к
урбанизированной среде методами молекулярной экологии**

Специальность 03.02.05 – энтомология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2018

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Городская среда сильно отличается от окружающих её естественных биотопов (Robinson, 1996), что заставляет обитающие в ней виды адаптироваться к факторам, действующим в условиях урбанизации. Насекомые являются объектом многих эволюционных исследований, из-за удобной для изучения популяционной структуры и динамики, а также из-за своей хозяйственной значимости. Наиболее изученной темой в рамках антропогенной эволюции насекомых является проблема устойчивости насекомых к инсектицидам (Hou et al., 1998, Hemigway et al., 2004, Amichot et al., 2004, Gatton et al., 2013) и её молекулярно-генетические основы.

К настоящему времени накопилось множество работ, выявивших закономерности и различия в адаптации разных групп насекомых к городским условиям (Raupp et al., 2010, Еремеева, Суцев, 2005, Boussaa et al., 2005), однако немногие изучали данные процессы на генетическом уровне, и только одно исследование проводилось в масштабе полного генома (Asgharian et al., 2015). Предыдущие сравнительные исследования геномов муравьев проясняли механизмы кастовой дифференциации и полиэтизма (Bonasio et al., 2010, Mikheyev, Linksvayer, 2015), а также успех инвазивных видов (Wurm et al., 2011, Smith et al., 2011a) и изменения в физиологии, связанные с пищевой специализацией у муравьев-листорезов (Nygaard et al., 2011). Популяционно-генетические исследования помогли понять, как возникла полигиния у *Solenopsis invicta* при интродукции (Gotzek, Ross, 2007).

Чёрный садовый муравей *Lasius niger* — распространённый в палеарктике вид, один из самых изученных видов семейства Formicidae (Hymenoptera). В сообществах муравьев многих городов Европы он является доминантом, при этом его численность в городских биотопах может даже увеличиваться (см. рис. 1) по сравнению с природными (Путятин, 2011, Антонов, 2013, Блинова, 2008, Czechowski, Ślipiński, 2008). Успех *L. niger* в городе пытались объяснить с особенностями питания и симбиозом с тлями, территориальным и гнездовым поведением (Путятин, 2011). Однако для изучения антропогенной эволюции необходимо знать её генетические основы, чтобы оценить роль естественного отбора в формировании адаптаций. В тех случаях, когда генетические основы фенотипической адаптации неизвестны, применяется подход «обратной экологии» (Li et al., 2008), при котором сначала определяются гены, на которые действует отбор, а уже потом

предполагается адаптивный фенотип по набору этих генов. Сравнение генома *L. niger* с другими известными геномами муравьев помогает выявить возможные преадаптации и особенности генома и связать их с особенностями биологии и экологии вида, как это было ранее сделано, например, для *Solenopsis invicta* (Wurm et al., 2011) и *Linepithema humile* (Smith et al., 2011a).

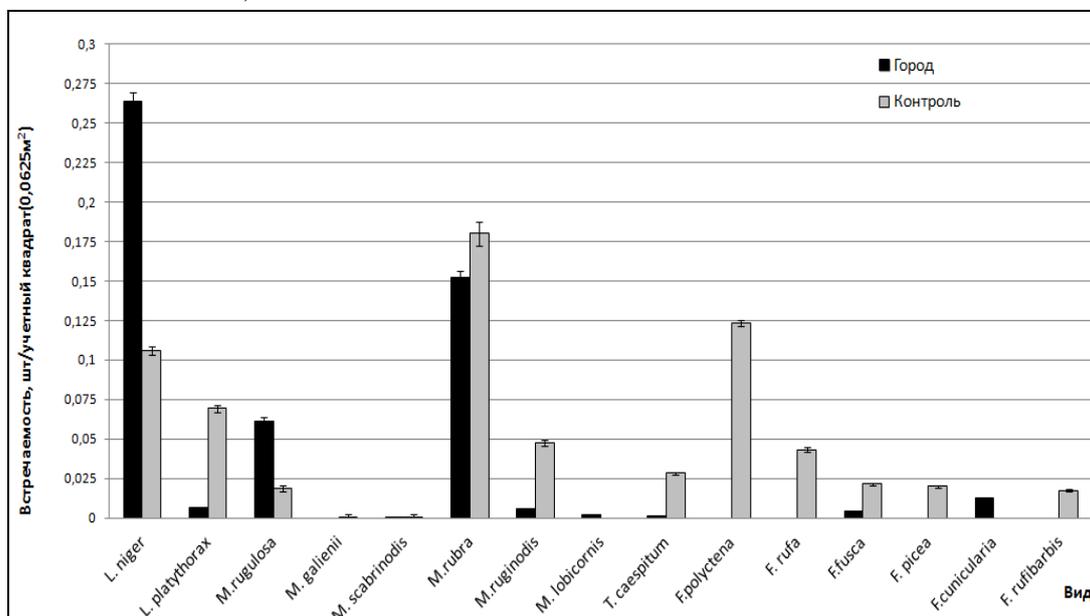


Рисунок 1. Встречаемость муравьев в г. Москве и Московской области (из Коноров, Путятин, 2013)

Микробиом *L. niger* малоизучен. При этом городская среда может приводить к изменению состава и соотношения микробиоты насекомых и их жилищ, создавая таким образом новые условия, к которым нужно адаптироваться. Например, известно, что при увеличении загрязнения окружающей среды снижается число *Actinomyces* в гнездах *L. niger* (Petal-Figielska, 1998), в то время как актиномицеты могут служить защитой от патогенов для муравьев рода *Lasius* (Kost et al., 2007). Метагеномика обладает многими преимуществами перед классическими микробиологическими методами, поскольку позволяет выявить некультивируемые виды и определить соотношение микроорганизмов в образце (Handelsman, 2004).

Таким образом, для изучения молекулярно-генетических основ адаптации насекомых к городским условиям сравнение метагеномов и полных геномов *L. niger* из городских и природных биотопов подходит как с точки зрения выбора объекта, так и с точки зрения метода.

Целью работы является изучение на геномном и метагеномном уровне адаптации и преадаптации *L. niger* к урбанизированным биотопам.

Задачи

1. Сравнить геном *L. niger* с другими известными геномами муравьев по генным семействам, ранее изученным у перепончатокрылых и представляющим интерес с точки зрения адаптации к городским условиям.
2. Сравнить геномы муравьев *L. niger* из природных и городских популяций по частотам однонуклеотидных полиморфизмов в масштабе генома.
3. Сравнить бактериальный, грибной и вирусный метагеном муравьев *L. niger* из городских и природных популяций.

Научная новизна

Автором впервые проведена функциональная аннотация генома чёрного садового муравья. Также получена сборка генома *L. flavus*.

Впервые описаны цитохромы р450, обонятельные рецепторы, одорант-связывающие белки чёрного садового муравья и другие генетические системы, которым ранее (Smith et al., 2011a, Bonasio et al., 2010, Wurm et al., 2011, Simola et al., 2014) приписывалась роль в расширении спектра питания и формировании особенностей поведения и экологии муравьев. Для цитохромов р450 девятого семейства (CYP9) впервые произведено предсказание функции детоксикации фито- и микотоксинов с помощью молекулярного моделирования.

Проведено полногеномное сравнение между городскими и природными популяциями *L. niger*, а также одно из немногих сравнений метагеномов между популяциями одного вида муравьев (и первое, посвящённое проблеме изменений микробиоты при адаптации насекомых к городским условиям). Полученные результаты позволяют сделать вывод о важности иммунной системы при адаптации муравьев к городским условиям, ранее на этот аспект не обращали внимания, хотя было известно, что функциональный состав микробиоты в гнезде муравьев в городской среде может меняться (Petal-Figielska, 1998).

С помощью метагеномного анализа впервые описан состав вирусов чёрного садового муравья и выдвинута гипотеза о его возможной роли в переносе вирусов животных и растений.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты раскрывают возможные пути адаптации муравьев и других насекомых к городским условиям. Обнаруженные различия в доле энтомопатогенных микроорганизмов и вирусов вместе с изменениями в генах иммунной системы муравьев из городских и природных популяций подтверждают необходимость изучения микробиоты при адаптации к сильным изменениям окружающей среды.

Данные молекулярного моделирования и докинга СYP9 *L. niger* с фито-, микотоксинами и инсектицидами позволяют предсказать низкую эффективность некоторых инсектицидов (в том числе растительного происхождения, таких как азадирахтин) по отношению к чёрному садовому муравью.

Аннотированный геном *L. niger* выложен в открытые базы данных и уже используется другими исследователями для дальнейших молекулярно-генетических исследований данного вида, в частности для филогенетики муравьев (Branstetter et al., 2017).

Данные метагеномного анализа говорят о том, что *L. niger* может являться переносчиком вируса Шамонды, вируса осповакцины, вируса жёлтой мозаики цуккини и вируса хлоротической пятнистости перца.

Личный вклад автора

Фильтрация и коррекция чтений, а также сборка генома *L. flavus* произведена самим автором.

Функциональная аннотация геномов *L. niger* и *L. flavus*, переаннотация геномов других муравьев, сравнение геномов, выравнивание и построение филогенетических деревьев генных семейств, поиск отбора в последовательностях производилась лично автором. Поиск мобильных элементов, фильтрация сборки от контаминации, предсказание генов осуществлялась совместно с М.А. Никитиным.

Лично автором было проведено молекулярное моделирование, молекулярный докинг и виртуальный скрининг СYP9 муравьев.

Полногеномное сравнение популяций осуществлялось полностью самим автором.

Сравнение бактериальных и грибных метагеномов, обсуждение результатов по сравнению бактериальных и грибных микробиомов является совместной работой автора и М.Б. Адаева. Сравнение вирусных метагеномов, а также анализ метатранскриптомов производились автором лично.

Основные результаты получены лично автором. Обсуждение, основные положения и выводы диссертации сформулированы лично автором.

Апробация работы

Основные результаты данной работы были доложены и обсуждены на следующих конференциях:

1. 4-й Московская международная конференция “Молекулярная филогенетика MolPhy-4” (Москва, Россия, 23 – 25 сентября 2014 г.);

2. Евроазиатский симпозиум по перепончатокрылым насекомым (III симпозиум стран СНГ) (Нижний Новгород, Россия, 6 – 12 сентября 2015 г.);
3. Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/BGRS-2016 (Новосибирск, Россия, 29 августа – 2 сентября 2016).

Публикации по теме диссертации

По материалам работы опубликовано 7 печатных работ, из них 3 — в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ (2 в журналах из Перечня ВАК, 1 — в высокорейтинговых иностранных рецензируемых журналах), 4 — в материалах международных и всероссийских конференций.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа изложена на 189 страницах, содержит 8 рисунков (из них 4 в приложении), 28 таблиц (из них 6 в приложении) и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, благодарности, список литературы, приложение. Список литературы включает 309 работ (из них 19 на русском и 290 на иностранных языках).

Благодарности

Автор благодарит А.В. Маркова за научное руководство, интерес к проекту, В.А. Скобееву и С.В. Нуждина за возможность реализации проекта по изучению генома чёрного садового муравья, за помощь и поддержку в работе на всех её этапах, М.А. Никитина — за обучение большинству использованных методов, участие в обсуждении результатов, помощь, советы и поддержку, С.Н. Лысенкова — за советы по статистической обработке данных, работе с текстом, подготовке диссертации, обсуждению полученных результатов, Г.М. Длусского — за привитую любовь к объекту. Автор также благодарит за помощь на разных этапах работы К.В. Михайлова, М.Ю. Беленького, М.Б. Адаева, В.Н. Новоселецкого, Н.С. Змановского, А.Ю. Панчина, Ю.В. Панчина, Х. Асгхариана, Н.Ю. Опарину, А.С. Михеева, Т.С. Путятину, К.С. Перфильеву, Н.Ю. Оюн, И.В. Артюшина, а также коллег, родных и друзей — за поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

Сформулированы цели и задачи исследования, обоснованы актуальность темы, ее научная новизна, теоретическое и практическое значение, обозначены положения, выносимые на защиту.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассмотрены антропогенная эволюция насекомых и факторы, влияющие на жизнь насекомых в городе. Отдельно рассмотрена проблема адаптации насекомых к ксенобиотикам, а также физиологический и поведенческий пути адаптации к ним насекомых. Разобраны работы, рассматривавшие изменение фауны и биологии муравьев в городских условиях (Блинова, 2007, Блинова, 2008, Путятин, 2011, Angilletta et al., 2007), и особенности биологии, экологии и этологии изучаемого вида *L. niger*, способствующие освоению трансформированных экосистем (Путятин, 2011, Czechowski et al., 2012, Антонов, 2013, Блинова, 2008). Отдельное внимание уделено генетическим основам адаптации насекомых (муравьям в том числе) к урбанизированным биотопам.

Также раскрыт предмет молекулярной экологии и способы применения молекулярно-генетических и биоинформатических методов для решения экологических задач, в частности, подход “обратной экологии” (Li et al., 2008). Приведены подробные описания методов функциональной, сравнительной и популяционной геномики и метагеномики. Подробно разобраны теоретические основы детекции отбора по данным нуклеотидных последовательностей как внутри вида, так и между видами.

Приведено описание известных геномов муравьев, а также особенности биологии и экологии данных видов (Bonasio et al., 2010, Oxley et al., 2014, Suen et al., 2011, Smith et al., 2011a, Smith et al., 2011b, Wurm et al., 2011, Mikheyev, Linksvayer, 2015, Smith et al., 2015), а также описаны результаты работ по их сравнению (Simola et al., 2013, Gadau et al., 2012).

Рассмотрены генные семейства и генетические системы организма, рассматривавшиеся в ходе сравнения геномов муравьев и в исследованиях адаптации насекомых к урбанизированным биотопам. Дана характеристика наиболее изученным на геномном уровне генным семействам муравьев: цитохромам P450, обонятельным рецепторам, одорант-связывающим белкам, синтазам жирных кислот, а также генам иммунной системы насекомых.

Также приведён обзор работ по бактериальному, вирусному и грибному метагеному и микробиому муравьев (He et al., 2011, He et al., 2014, Lucas et al., 2017, Anderson et al., 2012, Ishak et al., 2011), в том числе

L. niger (Закалюкина и др., 2014, Kost et al., 2007, Голиченков и др., 2011, Петерсон и др., 2016).

Приведён краткий обзор методов молекулярного моделирования, молекулярного докинга и виртуального скрининга лигандов. Отмечены работы, использующие данные методы для функционального описания белков насекомых, в частности работы по моделированию взаимодействий цитохромов P450 и инсектицидов (Chandor-Proust et al., 2013, Jones et al., 2010, Niu et al., 2011).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал, использованный в работе. Для секвенирования генома муравьи *L. niger* были взяты из двух локаций: на территории МГУ и из Истринского района Московской области. Из каждой локации рабочие особи были собраны эксгаустером из трех мест (из пяти гнезд в каждом) и помещены в 98% этанол. Из каждой из шести выборок (от 45 до 76 рабочих особей) были приготовлены библиотеки геномной ДНК и прочтены как парноконцевые чтения длиной 100 п.о. на Illumina HiSeq 2500. На выходе получены 423 миллионов чтений ДНК из объединенных библиотек.

Для секвенирования транскриптома были собраны в RNAlater отдельно рабочие муравьи, самка и самцы *L. niger* с территории кампуса МГУ имени М.В.Ломоносова. РНК выделялась с помощью RNA isolation kit. Транскриптом был отсеквенирован на платформе Illumina MiSeq (использованы парноконцевые чтения длиной 250 п.о.).

Для сборки генома *L. flavus* были собраны в 98% этанол рабочие особи. Были приготовлены библиотеки геномной ДНК и прочтены как парноконцевые чтения длиной 250 п.о. на Illumina MiSeq.

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности исследуемых генов и их белковых продуктов были взяты из баз данных GenBank, RefSeq и Hymenoptera Genome Database.

Использованный для метагеномного анализа транскриптом рабочих муравьев, выращенных в лабораторных условиях, был получен из архива коротких чтений NCBI (BioProject ID PRJNA352917).

Сборка генома *L. niger* и *L. flavus* и их функциональная аннотация

Геном был собран с помощью SPAdes (Bankevich et al., 2012). Короткие чтения и полученная сборка загружены в базу данных при NCBI под идентификационным номером BioProject PRJNA171386. Для

предсказания границ генов использована программа Augustus (Stanke, Morgenstern, 2005).

Для поиска похожих последовательностей применена программа blastp по базе данных refseq_protein. Были составлены базы данных последовательностей *Oocera (Cerapachys) biroi* (Dorylinae), *Monomorium pharaonis* (Myrmicinae), *Vollenhovia emeryi* (Myrmicinae), *Wassmania auropunctata* (Myrmicinae), *Camponotus floridanus* (Formicinae), *Acromyrmex echinator* (Myrmicinae), *Harpegnathos saltator* (Ponerinae), других перепончатокрылых *Apis mellifera*, *N. vitripennis*, и двукрылого *Drosophila melanogaster* отдельно для генных семейств: цитохромы P450, обонятельные рецепторы, одорант-связывающие белки, десатуразы, 30 семейств/подсемейств нейропептидов и рецепторов к ним, глутатионтрансферазы. По этим базам данных произведен поиск похожих последовательностей с помощью программы blastp для всех предсказанных белковых последовательностей *L. niger*, *Solenopsis invicta* (Myrmicinae), *Atta cephalotes* (Myrmicinae), *Linepithema humile* (Dolichoderinae), *Pogonomyrmex barbatus* (Myrmicinae). Далее был проведен проверочный запуск blastp и дополнительный поиск с помощью с помощью HMMER (Eddy, 2009). Подобным образом с помощью BLASTP и HMMER осуществлялся поиск ретровирусных белков (gag, pol, env) в геномах муравьёв.

Филогенетический анализ и детекция отбора.

Отобранные последовательности цитохромов P450, обонятельных рецепторов внутри каждого семейства были выровнены с помощью программы MUSCLE, входящей в пакет MEGA6.0. Для каждого из построенных выравниваний построено дерево методом максимального правдоподобия с помощью пакета MEGA6.0 (модель замен подбиралась по минимальному BIC, число реплик бутстрепа — 500). Для выявления генов, подверженных отбору, проведен попарный Z-тест, входящий в пакет MEGA6.0. Для семейства CYP9 отобраны исключительно полные кодирующие последовательности длиной и методами SLAC, FEL (Kosakovsky Pond et al., 2005), FUBAR (Murrell et al., 2013) и MEME (Murrell et al., 2012) произведен поиск отбора для каждого кодона в выравнивании, полученном с помощью MUSCLE.

Молекулярное моделирование и докинг CYP9.

Для моделирования предсказанных белков CYP9 *L. niger* g7627 (Genbank ID: KMQ92393.1), g7628 (KMQ92392.1) методом протягивания по аминокислотным последовательностям использовалась программа I-TASSER (Zhang, 2008). Предсказанные белковые последовательности

СУР9, принадлежащие *L. niger* (8 последовательностей) и другим видам муравьев (13 последовательностей) выровнены с аминокислотной последовательностью g7627 и смоделированы по гомологии с помощью программы MODELLER 9.13 (Eswar et al., 2008). Из базы данных ZINC были отобраны 188 моделей соединений, которые предполагались возможными лигандами к цитохромам P450. Для каждой из 23 моделей произведен молекулярный докинг и виртуальный скрининг данных соединений с помощью программы iGEMDOCK. Для каждой пары белок-лиганд получено 10 комплексов. Далее были отобраны комплексы, в которых лиганд находится над плоскостью гема, а также свободная энергия которых ниже -100 кал/моль. Для всех лигандов получены онтологии из базы данных ChEBI (Degtyarenko et al., 2007) и проведен анализ представленности онтологий в отобранных комплексах.

Полногеномное сравнение популяций

Короткие чтения *L. niger* картированы на геном чёрного садового муравья с помощью программы BWA (Li, Durbin, 2009) отдельно для городских и природных образцов. Среднее покрытие городской выборки составило 10,4x, для образцов из Московской области — 15x. С помощью пакета PoPoolation (Koffler et al., 2011a) рассчитано D Таджимы для каждого гена. С помощью PoPoolation2 (Koffler et al., 2011b) для каждого гена рассчитаны частоты аллелей и индекс фиксации.

Метагеномный анализ

Были проанализированы метагеномы шести выборок *L. niger* из Москвы и Московской области, а также транскриптомы муравьев, собранных в Москве и выращенных в лабораторных условиях. Для локального выравнивания коротких чтений использована программа BLASTN, с e-значением равным 0.001. Поиск соответствия осуществлялся по базам данных Fungal 18S Ribosomal RNA (SSU) RefSeq Targeted Loci Project и 16S ribosomal RNA Targeted Loci Project, а также объединённым базам данных RefSeq вирусных геномов. Полученные выравнивания проанализированы с помощью программы MEGAN v.5.10.6.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сборки геномов *L. niger* и *L. flavus*

Общая длина сборки генома чёрного садового муравья составляет 245 млн п.о., медианная длина контига (N50) равна 16382 п.о., оценка полноты сборки по SEGMA составляет 98,8%. По результатам генной аннотации у *L. niger* обнаружилось 18247 гена, из них 12207 – полные.

Геном *L. flavus* полон лишь на 72% (92% учитывая частичные гены, SEGMA), медианная длина скаффолда составила всего 3,2 тысяч п.о. Данные по геному *L. flavus* были использованы только для сравнения с *L. niger* расположения в геноме генов CYP9.

Повторяющиеся элементы генома и белки ретровирусов и ретротранспозонов

По сравнению с другими муравьями, для которых проводился схожий анализ, число повторяющихся элементов в геноме чёрного садового муравья меньше в 3-5 раз по доле в геноме. По общему размеру (3,47 МВ) повторяющихся элементов *L. niger* уступает *C. floridanus* в 2,5 раза (8.6 МВ), а *H. saltator* — в 8,5 раз (30 МВ). LTR элементов найдено больше, чем у других муравьев и *A. mellifera*.

Длинные концевые повторы (LTR) фланкируют гены ретровирусов и ретротранспозонов. Помимо их большего количества в геноме *L. niger*, найдено гораздо больше ретровирусных генов *gag* и *pol* (475 генов *pol* или *gag-pol*, у других муравьев от 4 до 55). Предположительно данные гены принадлежат ретротранспозонам, а не ретровирусам.

Цитохромы P450

Цитохромы P450 (CYP) сильно дублицированы у чёрного садового муравья. Всего обнаружено 72 гена из 11 семейств CYP в геноме *L. niger* и 15 случаев тандемных дубликаций CYP. Число генов семейства CYP9 у *L. niger* увеличено по сравнению с остальными муравьями (см. табл. 1), а также по сравнению с *A. mellifera* и *N. vitripennis*. Найдено 19 полных и 21 неполный, кодирующий больше половины продукта, генов. У остальных муравьев и *A. mellifera* число известных генов семейства CYP9 не превышает 25.

По результатам Z-теста все последовательности CYP9 муравьев находятся под положительным отбором. Методом MEME, способным проверить наличие отбора для каждого аминокислотного остатка, обнаружено 59 позиции в выравнивании CYP9 муравьев, на которые действовал эпизодический положительный отбор ($p < 0,05$). Также найдено 469 сайтов под очищающим отбором.

Одиннадцать из позиций, находящихся под положительным отбором, расположены в лиганд-связывающем кармане фермента.

При выравнивании двух геномов садовых муравьев (*L. niger* и *L. flavus*) в регионах генома, где располагаются недавние дубликации CYP9, у *L. flavus* почти во всех случаях один из дублицированных генов полностью или частично отсутствует.

Таблица 1. Число генов цитохромов P450 у исследуемых видов.

| Вид | Семейство цитохромов p450 | | | Всего |
|------------------------|---------------------------|------|------|-------|
| | CYP4 | CYP6 | CYP9 | |
| <i>L. niger</i> | 10 | 9 | 40 | 72 |
| <i>C. floridanus</i> | 24 | 20 | 13 | 75 |
| <i>H. saltator</i> | 11 | 18 | 16 | 61 |
| <i>A. echinator</i> | 10 | 14 | 17 | 53 |
| <i>A. cephalotes</i> | 10 | 9 | 3 | 35 |
| <i>S. invicta</i> | 16 | 22 | 8 | 57 |
| <i>L. humile</i> | 14 | 23 | - | 54 |
| <i>P. barbatus</i> | 15 | 13 | - | 42 |
| <i>C. biroi</i> | 16 | 10 | 23 | 71 |
| <i>A. mellifera</i> | 5 | 15 | 5 | 38 |
| <i>N. vitripennis</i> | 31 | 29 | 17 | 93 |
| <i>M. faraonis</i> | 22 | 27 | 22 | ? |
| <i>C. obscurior</i> | 6 | 6 | 6 | ? |
| <i>V. emeryi</i> | 12 | 32 | 11 | ? |
| <i>W. auropunctata</i> | 22 | 26 | 25 | ? |

Результаты молекулярного докинга и виртуального скрининга

Всего было построено 23 модели CYP9 муравьев, из которых 10 — для белков *L. niger*. По результатам молекулярного докинга были отобраны 226 энергетически выгодных комплексов белок-лиганд, из них 70 — для цитохромов p450 *L. niger*.

По онтологиям ChEBI среди лигандов, вступающих в комплексы с CYP9 муравьев, относительно всех возможных пар белок-лиганд значительно меньше (точный тест Фишера, $p < 0,05$) инсектицидов и поллютантов, но значительно больше фито- и микотоксинов.

Также с помощью iGemdock были определены аминокислотные остатки, вызывающие наибольшее понижение энергии. Они были сопоставлены с выравниванием CYP9 муравьев. Оказалось, что 143, 241 и 405 позиции в выравнивании, находящиеся под положительным отбором, также обеспечивают понижение свободной энергии почти для всех изученных белков CYP9, то есть участвуют в связывании лиганда.

Обонятельные рецепторы и одорант-связывающие белки

Среди генов *L. niger* было обнаружено 75 предположительных обонятельных рецептора и 3 одорант-связывающих белка, что меньше по сравнению с другими муравьями и *A. mellifera* (см. табл. 2).

Метагеном *Lasius niger*

Около 0.16% геномных чтений *L. niger* картируются на 16S рРНК бактерий и 18S рРНК грибов, ещё 0,06% — на вирусные геномы.

Таблица 2. Число генов обонятельных рецепторов и одорант-связывающих белков и *A. mellifera*.

| Вид | Количество предсказанных генов обонятельных рецепторов | Количество предсказанных генов одорант-связывающих белков |
|------------------------|--|---|
| <i>L. niger</i> | 74 | 3 |
| <i>C. floridanus</i> | 225 | 7 |
| <i>A. echinatio</i> | 118 | 9 |
| <i>A. cephalotes</i> | 269 | 12 |
| <i>S. invicta</i> | 193 | 16 |
| <i>P. barbatus</i> | 273 | 13 |
| <i>H. saltator</i> | 157 | 11 |
| <i>L. humile</i> | 156 | 12 |
| <i>C. biroi</i> | 474 | 18 |
| <i>M. pharaonis</i> | 325 | 17 |
| <i>V. emeryi</i> | 424 | 20 |
| <i>W. auropunctata</i> | 391 | 19 |
| <i>C. obscuritor</i> | 155 | 12 |
| <i>A. mellifera</i> | 127 | 21 |

Всего в ходе метагеномного анализа было найдено 44 рода бактерий из 40 семейств. На 4 рода бактерий — *Acetobacter*, *Burkholderia*, *Hydrogenovibrio*, *Spiroplasma* — приходится 99,9% чтений (см. табл. 3). Различия между городскими и природными популяциями по доле *Spiroplasma* и Enterobacteriaceae статистически значимы ($p < 0,5$, точный тест Фишера).

Таблица 3. Сравнение доли основных компонентов бактериальной микробиоты *L. niger* в городских и природных популяциях

| Род/семейство бактерий | Процент в метагеноме муравьев из природных местообитаний | Процент в метагеноме муравьев из городских местообитаний | p-значение точного теста Фишера (сравнение доли бактерий между популяциями) |
|------------------------|--|--|---|
| <i>Acetobacter</i> | 2,33 | 2,16 | 0,29 |
| <i>Burkholderia</i> | 91,13 | 83,16 | 0,15 |
| <i>Hydrogenovibrio</i> | 6,44 | 5,27 | 0,11 |
| <i>Spiroplasma</i> | 0,01 | 9,12 | 0,00 |
| Oxalobacteraceae | 0,02 | 0,13 | 0,09 |
| Enterobacteriaceae | 0,004 | 0,08 | 0,02 |

Всего идентифицировано 56 родов грибов из 51 семейства в метагеноме *L. niger* (см. табл. 4). Все грибы, доля которых в метагеноме больше 1%, присутствуют также и в метатранскриптомах (кроме *Dentocorticium*). В метагеноме муравьев из Московской области отсутствуют *Paraglomus* и грибы семейства Ophiocordycipitaceae.

Самым распространённым вирусом в метагеноме является вирус жёлтой мозаики цуккини (более 80% от вирусных чтений). Другими вирусами, на которых приходится больше 1% от общего числа чтений вирусов, являются вирус осповакцины, грануловир *Choristoneura occidentalis*, вирус хлоротической пятнистости перца и вирус Шамонды (рис. 3)

Таблица 4. Сравнение доли основных компонентов грибной микробиоты *L. niger* в городских и природных популяциях. Те роды, которые также обнаружены в транскриптом городских *L. niger*, выделены жирным. Подчёркиванием выделены те роды и семейства, которые также обнаружены в транскриптом выращенных в лабораторных условиях *L. niger*.

| Род/семейство бактерий | Процент в метагеноме муравьев из природных местообитаний | Процент в метагеноме муравьев из городских местообитаний | р-значение точного теста Фишера (сравнение доли грибов между популяциями) |
|------------------------------|--|--|---|
| <i>Psora</i> | 0,15 | 0,08 | 0,58 |
| <i>Trichoderma</i> | 68,23 | 75,78 | 0,20 |
| <i>Dipodascus</i> | 0,11 | 0,14 | 0,81 |
| <u><i>Saccharomyces</i></u> | 26,56 | 19,65 | 0,32 |
| <i>Dentocorticium</i> | 1,40 | 1,01 | 0,69 |
| <u><i>Marasmius</i></u> | 0,25 | 0,21 | 1,00 |
| <i>Dasturella</i> | 0,30 | 0,28 | 1,00 |
| <i>Graphiola</i> | 0,01 | 0,14 | 0,05 |
| <i>Ambispora</i> | 0,13 | 0,05 | 0,23 |
| <u><i>Acaulospora</i></u> | 1,45 | 0,67 | 0,21 |
| <u><i>Glomus</i></u> | 0,99 | 1,45 | 0,44 |
| <u><i>Paraglomus</i></u> | 0,00 | 0,16 | 0,01 |
| <i>Pleistophora</i> | 0,09 | 0,03 | 0,51 |
| Ophiocordycipitaceae | 0,00 | 0,12 | 0,15 |
| <u>Cordycipitaceae</u> | 0,10 | 0,10 | 0,60 |

Метагеномы муравьев из городских и природных популяций *L. niger* значительно отличаются по доле асковируса *За Heliothis virescens*, папилломовируса человека, вируса осповакцины, а также альфабакуловируса и иридовируса (см. рис. 2).

В метатранскриптомах муравьев присутствуют чтения, принадлежащие вирусу Шамонды, грануловир *Choristoneura occidentalis*, вирусу осповакцины, альфабакуловирсам.

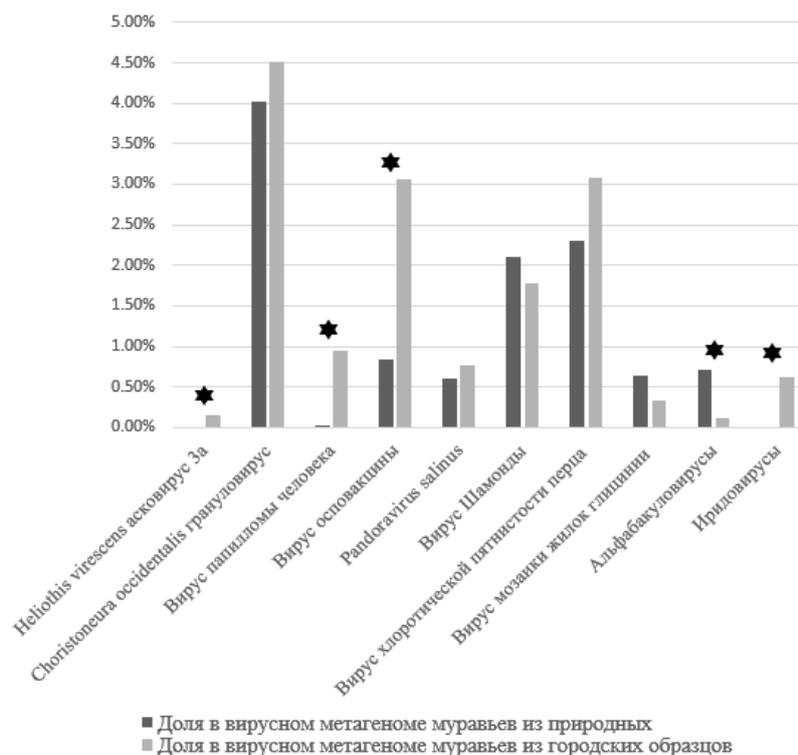


Рисунок 2. Сравнение доли основных вирусов (кроме вируса жёлтой мозаики цуккини) *L. niger* между городскими и природными выборками (звёздочкой выделены вирусы, доли которых значительно отличаются)

Отличия в частотах аллелей и следы естественного отбора между городскими и природными популяциями муравьев

По результатам полногеномного популяционного сравнения муравьев из г. Москвы и Московской области обнаружены значимые отличия ($p < 0,5$, точный тест Фишера) по спектру аллелей для 64 генов *L. niger*. Средний индекс фиксации в среднем по всем генам *L. niger* составил 0,066.

Почти половину (26) из них составляют обратные транскриптазы или другие гены ретротранспозонов (см. табл. 3). Индекс фиксации данных генов был больше среднего по геному (минимальный 0,19, максимальный равен 1). Для семи генов возможен сценарий диверсифицирующего отбора (D Таджимы больше нуля), для двух — положительного или очищающего (D Таджимы меньше нуля).

Для остальных 38 генов индекс фиксации данных генов был значительно большим (от 0,4 до 1), чем средний по геному.

Между городскими и природными популяциями *L. niger* существуют отличия в частотах аллелей среди генов-репрессоров (krab-a-домен-содержащие белки) и генов-коактиваторов РНК-полимеразы II. Для одного из krab-a-домен-содержащих белков можно предполагать наличие диверсифицирующего отбора (см. табл. 3).

Таблица 3. Значимые отличия в частотах аллелей между городскими и природными популяциями *L. niger* и следы естественного отбора

| | Гены ретро-транспозонов | Гены, кодирующие синтазы жирных кислот | Гены, участвующие в иммунном ответе | Гены, регулирующие активность РНК-полимеразы II | Другие гены |
|---|-------------------------|--|-------------------------------------|---|-------------|
| Общее число генов | 26 | 3 | 6 | 4 | 25 |
| В том числе: предположительно под диверсифицирующим отбором | 7 | 3 | 2 | 1 | 4 |
| предположительно под положительным или очищающим отбором | 2 | - | 1 | | 1 |

Два гена *Hippo/Fat* сигнального пути отличаются по спектру аллелей между популяциями.

Несколько генов (*g2724*, *g5554*, *g4919*, *g5925*, *g7666* и *g3061*), отличающихся по спектру аллелей (см. табл. 3) у чёрных садовых муравьёв из г. Москва и Московской области участвуют в ответе на вирусные, бактериальные и грибковые инфекции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Амплификация *CYP9* как преадаптация к городским условиям

Цитохромы P450 (*CYP*) рассматривались в исследованиях геномов муравьёв из-за возможности метаболизировать ксенобиотики, а также из-за участия в метаболизме ювенильного гормона и экдизона насекомых (Simola et al., 2013). Также в ходе полногеномного сравнения комаров из городских и природных местообитаний (Asgharian et al., 2015), цитохромы P450 оказались среди генов под положительным отбором в городских популяциях. Чёрный садовый муравей обладает большим, чем у других муравьёв набором генов *CYP* девятого семейства, функция которых до недавнего времени оставалась неизвестной.

Белки *CYP9E* муравьёв по результатам произведенного автором молекулярного докинга и скрининга могут вступать во взаимодействия и с инсектицидами, и с фитотоксинами, и с микотоксинами.

Поскольку значительную часть рациона чёрного садового муравья составляют нектар растений и падь тлей (Czechowski et al., 2012), то приспособления к фитотоксинам могут играть важную роль в расширении пищевого спектра *L. niger*. Многие растения выделяют репелленты и

токсины, которые отпугивают муравьев, питающихся их нектаром. Например, была показана токсичность и отпугивающий эффект эфирных масел рутовых на рабочих *L. niger* (Mehmood F. et al., 2012). При этом некоторые авторы предлагают использовать эфирные масла и фитотоксины некоторых растений в качестве инсектицидов и репеллентов против *L. niger* (Георгиев и др, 2014).

Показано также, что узкоспециализированные фитофаги из рода *Papilio* обладают меньшим набором цитохромов P450, чем виды-генералисты из того же рода (Despres et al., 2007). Таким образом, обладая большим набором CYP9E *L. niger* может расширить спектр питания за счёт нектара растений, к фитотоксинам которых приспособлены его цитохромы p450.

В метагеноме *L. niger* самым распространённым грибом оказался род *Trichoderma*. Грибы данного рода способны производить T-2 токсин (Ueno, 1984) и цитохалазины (Chen et al., 2015), которые способны метаболизировать CYP9 муравьев. Имея большее количество CYP9E, *L. niger* обладает более широкими возможностями для специализации генов в ответ на специфический микотоксин. Исходя из этих данных, мы можем выдвинуть гипотезу, что отсутствие карантинного поведения *L. niger* к зараженным спорами *Bauveria bassiana* тлям, показанная в работах Новгородовой (Novgorodova, Kryukov, 2017), объясняется повышенной по сравнению с другими видами муравьев мощностью их системы обезвреживания микотоксинов.

Таким образом, амплификацию CYP9 можно рассматривать как преадаптацию к городским условиям за счёт потенциального увеличения спектра питания, а также из-за расширения возможностей для адаптации к инсектицидам и микотоксинам. Причём, по-видимому, амплификация генов CYP9 происходила после разделения линий, ведущих к *L. niger* и *L. flavus*, поскольку у жёлтого садового муравья отсутствуют многие дублицированные у чёрного садового муравья гены CYP9.

Потери генов обонятельной системы в связи с увеличением числа генов системы детоксикации

У насекомых есть два основных пути адаптации к аллелохимикатам: физиологический и поведенческий (Després et al., 2007), включение ксенобиотика в метаболизм либо его избегание. Между данными путями адаптации может возникать обратная связь: так, у капустной моли *Plutella xylostella* есть отрицательная корреляция в паттернах изменчивости между генами систем детоксикации и хемосенсорных белков, а также между уровнями экспрессии этих генов (Bautista et al., 2015).

У чёрного садового муравья обнаружено гораздо меньшее число обонятельных рецепторов и одорант-связывающих белков по сравнению с другими муравьями. Как обсуждалось выше, растения выделяют репелленты и фитотоксины против муравьев, собирающих нектар. Реакция на репеллент напрямую зависит от возможности обонятельного рецептора его распознавать, например, при уменьшении экспрессии гена *CquiOr132* *Culex quinquefasciatus* не проявляет реакцию на репеллент ДЭТА (Xu et al., 2014).

Таким образом, можно выдвинуть гипотезу о том, что поскольку большой набор цитохромов р450 позволял обезвреживать аллелохимикаты растений, то обонятельные рецепторы, способные реагировать на них, перестали быть необходимыми.

Увеличение числа транспозонов и связь с увеличением числа генов, отвечающих за репарацию ДНК

В геноме *L. niger* в несколько раз больше ретротранспозонов, чем у других муравьев. Часть генов ретротранспозонов значительно отличается по спектру аллелей между городскими и природными популяциями муравьев, и для нескольких из них различия возникли в результате положительного или диверсифицирующего отбора.

Известны случаи положительного отбора на транспозоны насекомых, например, у *D. melanogaster*, когда изменения при помощи транспозонов приводили к увеличению устойчивости к окислительному стрессу (Guio et al., 2014) и адаптации к местообитаниям с иным температурным режимом (González et al., 2010).

Ретротранспозоны используют РНК полимеразу II, их мобильность зависит от её активности (Havecker et al., 2004). У *L. niger* муравьи из городских и природных выборок отличаются по частотам генов, регулирующих активность РНК полимеразы II. Показано, что уменьшение активности РНК полимеразы II увеличивает мобильность ретротранспозонов (Thieme et al., 2017). Изменяя активность РНК полимеразы II, можно увеличить частоту инсерций транспозонов и таким образом увеличить скорость эволюции.

Среди перепредставленных генных онтологий в геноме чёрного садового муравья была GO “DNA repair” (репарация ДНК). Увеличение элементов системы репарации ДНК также может служить преадаптацией к обеспечению устойчивости к ксенобиотикам, приводящим к нарушениям структуры ДНК, таким как полициклические ароматические углеводороды. Данные соединения являются типичными загрязняющими веществами в городской среде (Larsen, Baker, 2003). При этом муравьи рода *Lasius* в

отличии от остальных муравьев при промышленном загрязнении не уменьшают свою встречаемость (Блинова, 2007).

Жирные кислоты во внутривидовой коммуникации муравьев

Муравьи способны синтезировать разнообразные химические соединения, которые используются как средства коммуникации внутри семьи, например, феромоны тревоги. В железе Дюфура чёрного садового муравья содержится более 50 органических соединений, некоторые из которых являются производными жирных кислот. Также жирные кислоты и их производные присутствуют в метаплевральных железах и в задней кишке муравьев, выполняя функции антигрибкового и антибактериального агента и следового феромона (Morgan, 2008). В синтезе данных соединений участвуют синтазы жирных кислот.

Три гена синтаз жирных кислот *L. niger* находятся под диверсифицирующим отбором между популяциями муравьев из г. Москва и Московской области. Присутствие сразу трёх генов синтаз жирных кислот среди генов под отбором (см. табл. 3) между городскими и природными популяциями чёрных садовых муравьев говорит об их возможной роли в адаптации к городским условиям. Ранее было отмечено, что при увеличении ксенобиотиков в окружающей среде снижается эффективность следового феромона муравьев (Лопатина Ю. В., Еремина О. Ю., 2010). В условиях городской среды при повышенной концентрации поллютантов и пестицидов (Robinson, 1996) муравьям, по-видимому, необходимо интенсифицировать либо усовершенствовать систему синтеза следового феромона.

Различия в генах иммунной системы между городскими и природными популяциями *L. niger*

Несколько генов, отличающихся по спектру аллелей у чёрных садовых муравьев из г. Москва и Московской области, участвуют в ответе на вирусные, бактериальные и грибковые инфекции у других насекомых. При этом три из них находятся под действием движущего или положительного отбора.

В метагеномах муравьев из городских и природных популяций наблюдаются значимые отличия по доле родов бактерий, грибов и вирусов, которые могут быть потенциально патогенны для муравьев (например, *Spiroplasma*, представители *Ophiocordycepsitaceae*, энтомопатогенные вирусы). Изменения в генах иммунного ответа могли быть вызваны необходимостью адаптироваться к увеличению доли патогенной микробиоты. Ранее отмечалось, что при увеличении загрязнения окружающей среды снижается число *Actinomyces* в гнёздах *L. niger* (Petal-

Figielska, 1998), при этом актиномицеты могут служить защитой от патогенов для муравьев рода *Lasius* (Kost et al., 2007).

Бактериальный и грибной микробиом *L. niger* и различия в микробиоте у муравьев из г. Москва и Московской области

В популяциях из лугов Московской области *Spiroplasma* практически отсутствует, в то время как в метагеноме муравьев из г. Москвы её в несколько раз больше, чем *Acetobacter*. Возможен путь передачи бактерий рода *Spiroplasma* через тлей (Kautz et al, 2013b), что может послужить объяснением её присутствия в урбанизированных и отсутствия в неурбанизированных биотопах. В городских условиях создаются более благоприятные условия для тлей (Еремеева, 2004), их численность растёт, что может привести к увеличению их влияния на микробиом муравьев, питающихся их падью.

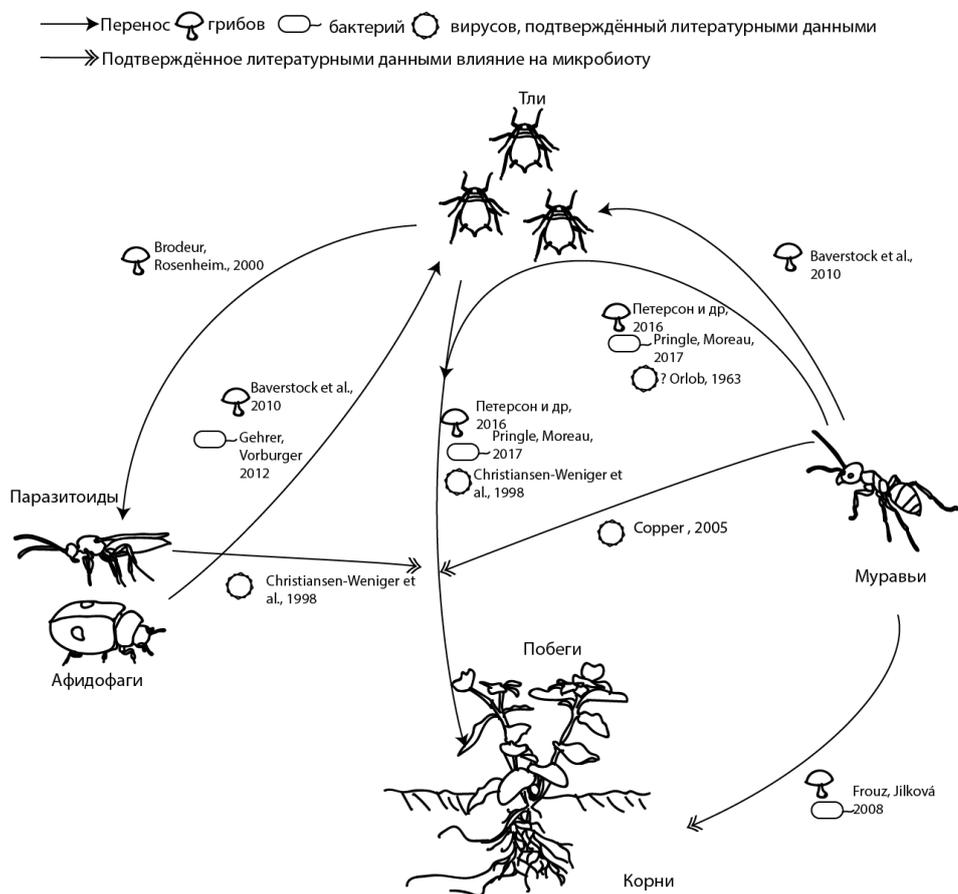


Рисунок 3 Циркуляция грибов, вирусов и бактерий в системе муравьев, тлей и связанных с ними растений

Роль данной бактерии для муравьев неизвестна, для других насекомых она может быть патогеном либо симбионтом, увеличивающим устойчивость к паразитам и паразитоидам (Kautz et al., 2013a, Fukatsu, 2001).

На рисунке 3 изображены известные на данный момент пути передачи микробиоты в системе растение-тли-муравьи. Для *L. niger* была показана передача грибов *Aspergillus niger* через тлей к яблоням (Петерсон и др., 2016).

Отдельной группой метагенома *L. niger* являются организмы, которые участвуют в образовании арбускулярной микоризы (*Ambispora Acaulospora*, *Glomus*, *Paraglomus*, *Pleistophora*). Даубер с соавторами показали, что муравьи рода *Lasius* способствуют распространению данных микроорганизмов к корням растения (Dauber et al., 2008). Примечательно, что при этом данные микроорганизмы по полученным нами данным присутствуют даже у муравьев, выращенных в лабораторных условиях, что может означать, что *L. niger* может долгое время сохранять эти микроорганизмы, увеличивая возможности для их распространения.

***L. niger* как возможный переносчик вирусов растений и животных**

В метагеноме *L. niger* найдено несколько энтомопатогенных вирусов. Наиболее представленным из них является грануловиром *Choristoneura occidentalis*. Присутствуют и другие вирусы чешуекрылых: грануловиром *Cydia pomonella*, асковирус 3а *Heliothis virescens*.

Среди вирусов млекопитающих самыми представленными в метагеноме *L. niger* оказались вирус осповакцины и вирус Шамонды, а также вирус папилломы человека. Первые два являются вирусами крупного рогатого скота (Peres et al., 2013, Hirashima et al., 2017). При этом резервуарами и переносчиками вируса осповакцины считаются домашние и дикие млекопитающие, в то время как насекомые таковыми не рассматриваются. Известными переносчиками вируса Шамонды являются комары.

Обнаружение трёх данных вирусов в метагеноме чёрного садового муравья ставит задачу подтверждения другими методами их наличия у муравьёв и возможности переноса основным хозяевам. Оба этих вируса найдены и в транскриптом городских муравьёв, а вирус Шамонды найден также в транскриптом муравьёв, выращенных в лаборатории. Это означает, что вирусы активны в теле муравья, при этом, скорее всего, не патогенны для него и способны передаваться внутри семьи.

Самым представленным среди вирусов по результатам метагеномного анализа оказался вирус жёлтой мозаики. Ранее обсуждалась возможная роль *L. niger* в передаче вирусов растениям (Orlob, 1963, Orlob 1966). Среди других вирусов растений присутствуют вирус хлоротической мозаики перца и вирус мозаики жилок глицинии. Чёрные садовые муравьи

в качестве переносчиков вирусов растений практически не изучаются, несмотря на то, что для других муравьев (*S. invicta*) показано, что в присутствии муравья доля заражённых вирусом мозаики огурца увеличивается (Corper, 2005). Результаты данной работы показывают, что *L. niger* может быть переносчиком фитопатогенных потивирусов и тосповирусов.

ВЫВОДЫ

1. Цитохромы р450 девятого семейства (CYP9) у *Lasius niger*, как и у других муравьев, находятся под действием положительного отбора и выполняют функцию детоксикации фито- и микотоксинов.
2. У *Lasius niger* по сравнению с другими муравьями больше генов CYP9, что можно рассматривать как преадаптацию к урбанизированным биотопам из-за потенциального расширения спектра питания (связанного с улучшенной детоксикацией фитотоксинов) и увеличения устойчивости к грибковым заболеваниям.
3. В линии, ведущей к *Lasius niger*, происходили потери генов обонятельной системы. Уменьшение числа генов обонятельной системы у *L. niger* можно рассматривать как преадаптацию к городским условиям из-за снижения чувствительности к репеллентам.
4. У *Lasius niger* в геноме найдено больше LTR ретротранспозонов, чем в геномах других муравьев, при этом некоторые из этих генов находятся под положительным и диверсифицирующим отбором между городскими и природными популяциями.
5. Городские и природные популяции *Lasius niger* отличаются по частотам аллелей синтазы жирных кислот (у других видов муравьев, участвующих в синтезе углеводов кутикулы и играющих важную роль во внутривидовой коммуникации), элементам сигнального пути Hippo/Fat, различия в которых могут приводить к морфологическим отличиям и генам иммунной системы, причем часть этих различий обусловлена действием естественного отбора.
6. В городских популяциях *Lasius niger* в отличие от природных популяций значительную часть микробиома составляют потенциально патогенные бактерии рода *Spiroplasma*, а также присутствуют патогенные грибы семейства *Orhilocordycepsitaceae*. В микробиоме муравьев *L. niger*, даже у тех, что выращены в лабораторных условиях, присутствуют микроорганизмы, участвующие в образовании арбускулярной микоризы.
7. Вирусный метагеном *Lasius niger* из городских и природных популяций отличается по числу энтомопатогенных вирусов таких, как

альфабакуловирусы, иридовирусы и асковирус *За Heliothis virescens*, а также по количеству вируса осповакцины. *Lasius niger* может служить переносчиком для патогенных вирусов животных и растений.

Публикации по теме диссертации

Научные статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS, RSCI, а также в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности

1. Коноров Е.А., Никитин М.А. Амплификация генов девятого семейства цитохромов р450 черного садового муравья *Lasius niger* как преадаптация к урбанизированным биотопам. // Молекулярная биология. 2015. Т. 49. № 3. С. 455–460.
2. Коноров Е.А. Поиск следов естественного отбора между популяциями чёрного садового муравья *Lasius niger* из урбанизированных и природных биотопов // Генетика. 2018. Т. 54. № 2. С. 224–232.
3. Konorov E.A., Nikitin M.A., Mikhailov K.V., Lysenkov S. N., Belenky M. Yu., Chang P. L., Nuzhdin S.V., Scobeyeva V. A. Genomic exaptation enables *Lasius niger* adaptation to urban environments // BMC Evolutionary Biology. 2017. V. 17. №. 39. P. 39.

Тезисы и материалы конференций

1. Коноров Е.А., Скобеева В.А. Что геном и транскриптом *Lasius niger* могут рассказать о его биологии? //Евроазиатский симпозиум по перепончатокрылым насекомым. Тезисы докладов. Издательство Нижегородского университета Нижний Новгород, 2015. С. 81–82.
2. Путьятина Т.С., Коноров Е.А. Биотопическое распределение муравьев на территории Москвы 2005-2012 гг //Материалы XIV Всероссийского мирмекологического симпозиума. Москва, 2013. С. 246–249.
3. Konorov E.A., Nikitin M.A., Mikhailov K.V., Scobeyeva V.A., Lysenkov S.N., Belenky M.Yu., Nuzhdin S.V. Amplification of CYP9 family of P450 cytochromes in *Lasius niger*: a preadaptation to urban environments? //Molecular Phylogenetics: Contributions to the 4th Moscow International Conference “Molecular Phylogenetics” (MolPhy-4), Moscow State University, Moscow, Russia. Moscow, Torus Press, 2014, p. 42
4. Konorov E.A., Scobeyeva V.A., Nikitin M.A. et al. Genome of black garden ant: defense against virus invasion? // The tenth international conference on bioinformatics of genome regulation and structure / Systems biology. — Novosibirsk, Russia, 2016. — P. 142–142.