

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ДРОЖЖЕВЫЕ СООБЩЕСТВА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ДВУКРЫЛЫМИ НАСЕКОМЫМИ ЛИТОРАЛИ БЕЛОГО МОРЯ

© 2020 г. И. А. Максимова^а, А. В. Качалкин^{а, б}, Е. Ю. Яковлева^{а, *},
М. Г. Кривошеина^с, А. В. Марков^{а, d}

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^бИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, 142290 Россия

^сИнститут проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, 119071 Россия

^dПалеонтологический институт им. А.А. Борисяка РАН, Москва, 117997 Россия

*e-mail: e.u.yakovleva@gmail.com

Поступила в редакцию 18.07.2019 г.

После доработки 10.09.2019 г.

Принята к публикации 29.11.2019 г.

Взаимоотношения симбиотических дрожжей с насекомыми отряда двукрылых (*Diptera*) изучаются в основном на модели плодовых мушек (сем. *Drosophilidae*). Эволюционные эксперименты показали, что изменения состава дрожжевой микробиоты, переносимой мухами в кишечнике и на поверхности тела, вносят вклад в адаптацию лабораторных популяций дрозофил к кормовым субстратам с повышенным содержанием NaCl. Хотя соленые субстраты обычно не используются дрозофилами в природе, в других семействах двукрылых есть виды, адаптированные к таким субстратам. Дрожжевые сообщества, ассоциированные с этими видами, практически не изучены. В данной работе впервые описываются дрожжевые сообщества, ассоциированные с двумя видами двукрылых литорали Белого моря: *Paracoenia fumosa* (Stenhammar, 1844) (сем. *Ephydriidae*) и *Fucellia fucorum* (Fallén, 1819) (сем. *Anthomyiidae*), личинки которых развиваются в прибрежных соленых лагунах и водорослевых выбросах соответственно. Дрожжевая микробиота *P. fumosa* включает оппортунистические виды *Pichia kluyveri* Bedford ex Kudryavtsev, 1960 и *P. kudriavzevii* Boidin, Pignal, Besson, 1965 и отличается непостоянством численности (число колониеобразующих единиц широко варьирует у разных особей). Для *F. fucorum* характерно более стабильное дрожжевое сообщество, включающее виды, типичные для беломорских водорослевых выбросов и прибрежных вод: *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder, Kreger-van Rij, 1952, *Metschnikowia zobellii* (van Uden, Castelo-Branco) van Uden, 1962, *M. bicuspidata* (Metschnikoff) Kamienski, 1899. У двух видов литоральных мух не найдено ни одного общего вида дрожжей. Кроме того, ни один из видов дрожжей, обнаруженных у литоральных мух, не был зарегистрирован в ходе эволюционного эксперимента по адаптации дрозофил к соленому кормовому субстрату (на родовом уровне сходство ограничивается единственным родом *Pichia*). Контрастные различия дрожжевого микробиома двух экологически схожих литоральных видов двукрылых могут указывать, с одной стороны, на специфичность, с другой — на эволюционную пластичность взаимоотношений между солелюбивыми мухами и дрожжами.

Ключевые слова: симбиотические дрожжи, *Diptera*, адаптация к соленым субстратам, литораль

DOI: 10.31857/S0026365620020081

Симбиотические микробы играют важную роль в жизни животных, влияя на их развитие, физиологию, приспособленность к условиям среды и эволюцию (Lee, Brey, 2013). Поэтому в рамках набирающей популярность “хологеномной теории эволюции” предлагается считать базовой единицей отбора не отдельный макроорганизм, а холобионт (Margulis, Fester, 1991), понимаемый как совокупность макроорганизма и всех сопутствующих микробов (Bordenstein, Theis, 2015).

Исключительно популярным модельным объектом для изучения взаимоотношений микробов и хозяина является плодовая мушка *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (сем. *Drosophilidae*) и, в меньшей степени, другие дрозофилы. Хотя микробиом дрозофил сравнительно прост, он во многом схож с более сложными микробиомами млекопитающих, таких как мышь и человек (Erkosar et al., 2013; Hoang et al., 2015; Trinder et al., 2017). Микробиом дрозофил может относительно устойчиво “наследоваться” в ряду поколений благодаря поеданию мухами субстрата, на кото-

ром до этого жили их родители и развивались личинки (Erkosar et al., 2013).

Большинство исследований в данной области фокусируется на кишечных бактериях, оказывающих многоплановое влияние на различные аспекты физиологии дрозофил (Brummel et al., 2004; Storelli et al., 2011; Erkosar et al., 2013). Немного меньше внимания уделяется ассоциированным с насекомыми дрожжам, составляющим важную часть симбиотического микробиома дрозофил (Starmer, Fogelman, 1986; Ganter, 2006). Дрожжи, развивающиеся на используемых дрозофилами кормовых субстратах, переносятся мухами в кишечнике и на поверхности тела. Дрожжи составляют важную часть рациона личинок и имаго, влияют на выживание, рост и развитие личинок, массу тела, плодовитость и продолжительность жизни имаго, работу иммунной системы и поведение (Starmer, Fogelman, 1986; Coluccio et al., 2008; Anagnostou et al., 2010; Stamps et al., 2012; Hoang et al., 2015;). Со своей стороны, личинки и имаго дрозофил влияют на видовое богатство дрожжевых сообществ, развивающихся на кормовых субстратах, стимулируя рост одних видов и подавляя другие (Stamps et al., 2012). Личинки дрозофил проявляют избирательность, предпочитая кормиться теми видами дрожжей, которые положительно влияют на их рост (Anagnostou et al., 2010). Для нескольких видов дрожжей показана способность выдерживать прохождение через кишечник личинок и имаго дрозофил, благодаря чему мухи могут служить эффективными переносчиками дрожжей в природе (Coluccio et al., 2008; Stamps et al., 2012; Hoang et al., 2015). Некоторые виды дрожжей производят летучие вещества, привлекающие дрозофил (Becher et al., 2012), причем самыми привлекательными не всегда оказываются продукты видов, наиболее благотворно влияющие на рост личинок (Anagnostou et al., 2010). Предполагается, что в ряде случаев это можно рассматривать как адаптацию, помогающую дрожжам использовать насекомых для своего распространения. Большая часть данных о симбиотических взаимоотношениях двукрылых с дрожжами получена на дрозофилидах (Stefanini, 2018). Поэтому остается неясным, в какой мере полученные выводы приложимы к другим двукрылым.

Симбиотические дрожжи, по-видимому, могут вносить вклад в адаптацию двукрылых к неблагоприятным кормовым субстратам. Это было показано на примере адаптации дрозофил к субстрату с повышенной концентрацией NaCl. Для дрозофил концентрация NaCl в корме, превышающая 2–3%, является негативным фактором, замедляющим их развитие и повышающим смертность (Te Velde et al., 1988; Stergiopoulos et al., 2009). Однако в ряде эволюционных экспериментов, начало которым положил еще Конрад Уоддингтон в се-

редине прошлого века (Waddington, 1959), было показано, что дрозофилы способны за несколько десятков поколений адаптироваться к концентрациям соли до 6–8% (Te Velde et al., 1988; Дмитриева и соавт., 2016). Традиционно считалось, что наблюдаемая в таких экспериментах адаптация является результатом изменений генофонда лабораторной популяции макроорганизмов (в данном случае дрозофил). Однако нами было показано, что в адаптацию дрозофил к соленому корму вносит важный вклад симбиотическая микробиота, в том числе ее дрожжевой компонент. Мы показали, что контрольные (“наивные”, не адаптированные к соли) мухи лучше размножаются на соленом кормовом субстрате, если на него был предварительно произведен посев гомогенизированных мух из адаптированных к соли линий. Посев гомогенизированных мух из контрольных линий такого эффекта не оказывает. Мы также показали, что количественный и качественный состав дрожжевой микробиоты мух из адаптированных к соли и контрольных линий существенно различается. Для адаптированных к соли линий, как правило, характерна повышенная общая численность дрожжей, а также присутствие вида *Starmerella bacillaris* (Kroemer, Krumbholz) F.L. Duarte, A. Fonseca, 2012, который отсутствует или имеет крайне низкую численность в контрольных линиях. Выяснилось также, что эффективность размножения мух на соленом субстрате повышается, если на субстрат были предварительно посеяны чистые культуры дрожжей, выделенные из адаптированных к соли мух (Панченко и соавт., 2017; Ивницкий и соавт., 2018; Dmitrieva et al., 2019).

Адаптация дрозофил к соленому корму — удобная и часто используемая в эволюционных экспериментах модельная система (Waddington, 1959; Te Velde et al., 1988; Stergiopoulos et al., 2009; Дмитриева и соавт., 2016), которая, однако, является в значительной мере искусственной. В природе дрозофилиды, как правило, не встречаются на субстратах с повышенной соленостью. Впрочем, среди двукрылых есть солелюбивые виды — специализированные обитатели соленых субстратов. Например, личинки многих видов мух из семейств *Anthomyiidae*, *Coelopidae*, *Heterocheilidae*, *Helcomyzidae* развиваются в прибрежной зоне морей и океанов в выброшенных на берег водорослях (Dobson, 1976), а водные личинки некоторых видов семейства *Ephydriidae* питаются детритом на дне водоемов с крайне высокой соленостью, таких как озеро Моно в Калифорнии, где большинство других водных животных не выживает (Herbst, 1988).

Экспериментальные данные о вкладе дрожжевого микробиома в адаптацию лабораторных линий дрозофил к соленому корму позволяют предположить, что и у настоящих солелюбивых (или солевыносливых) двукрылых адаптация к суб-

стратам с высокой соленостью может быть связана с теми или иными видами симбиотических дрожжей, переносимых в кишечнике или на поверхности тела. Проверка этого предположения затрудняется тем, что о симбиотических дрожжах таких двукрылых практически ничего не известно. В данной работе мы пытаемся частично восполнить этот пробел.

Целью исследования было охарактеризовать количественный и качественный состав дрожжевых сообществ, ассоциированных с двумя видами солевыносливых двукрылых с побережья Белого моря: *Paracoenia fumosa* (Stenhammar, 1844) (сем. *Ephydridae*) и *Fucellia fucorum* (Fallén, 1819) (сем. *Anthomyiidae*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изученные виды мух. Взрослые мухи обоих видов были пойманы летом 2018 года на Карельском берегу Белого моря. Имаго *Paracoenia fumosa* были пойманы сачком на мелководье в соленой лагуне (Кисло-Сладкое озеро) с илистыми донными отложениями с высоким содержанием сероводорода в окрестностях Беломорской биологической станции МГУ (ББС) (примерные координаты: 66.548° с.ш., 33.134° в.д.). *Fucellia fucorum* пойманы эксгаустером возле разлагающихся водорослей в верхней зоне литорали недалеко от Кузнецкого мыса (66.463° с.ш., 33.607° в.д.). Оба вида являются типичными обитателями морского побережья северной Карелии. Личинки *P. fumosa* развиваются в прибрежных соленых лагунах и лужах, эпизодически (при сильном волнении, в сизигийные приливы) заполняемых морской водой. Личинки *F. fucorum* развиваются в водорослевых выбросах в верхней части литорали и супралиторали. Пойманные имаго были помещены в пластиковые емкости с небольшим количеством соответствующего субстрата (ил со дна соленой лагуны или фрагменты водорослей из выбросов) и доставлены живыми в лабораторию в течение трех суток с момента поимки.

Количественный учет, выделение и идентификация дрожжей. Дрожжевое население 10 особей (имаго) *P. fumosa* и такого же количества имаго *F. fucorum* было изучено с помощью метода микробиологического посева на плотную питательную среду. Дрожжевое население каждой особи анализировали по отдельности. Муху помещали для обездвиживания в морозильную камеру с температурой –20°С на 3 мин. Затем из этой мухи и 0.5 мл стерильной водопроводной воды готовили гомогенат. Для этого в стерильные эппендорфы с водой помещали мух, растирали их стерильным силиконовым пестиком, а затем обрабатывали на вортексе Multi Reax (“Heidolph”, Германия) в режиме 1700 об./мин в течение 10 мин. Аликвоту полученной суспензии объемом 50 мкл наносили на

поверхность плотной питательной среды ГРҮа следующего состава (г/л): глюкоза – 20, пептон – 10, дрожжевой экстракт – 5, агар – 20. Для подавления роста бактерий в среду перед розливом добавляли левомицетин (1 г/л).

Выросшие колонии были разделены на макроморфологические типы и подсчитаны. В результате для каждого образца была определена общая численность дрожжей в образующих колонии единицах (КОЕ) на одну муху и относительное обилие выделенных видов дрожжей для исследованных видов мух. По два–три штамма из каждого морфотипа колоний было выделено в чистую культуру, а затем на основании культуральных и микроморфологических признаков все полученные культуры были сгруппированы.

Окончательную идентификацию осуществляли анализом нуклеотидных последовательностей D1/D2 доменов 26S (LSU) или ITS региона рДНК по методике, описанной в работе Глушаковой и соавт. (2011). Амплификацию регионов рДНК проводили с использованием праймеров ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA), NL4 (5'-G-GTCCGTGTTTCAAGACGG). Для секвенирования использовали праймеры NL4 или ITS1f. Секвенирование амплифицированных регионов проводили на секвенаторе Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer в компании ЗАО “Евроген” (Москва). Видовую идентификацию дрожжей по полученным сиквенсам осуществляли с помощью данных генбанка NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) и базы CBS (www.cbs.knaw.nl).

Полученные в ходе работы нуклеотидные последовательности для штаммов дрожжей были депонированы в генбанк NCBI (номера MN213698–MN213725).

Исследование солеустойчивости штаммов дрожжей проводили на среде ГРҮа с добавлением 1–10% NaCl, культивирование осуществляли при 22°С в течение 1 нед.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Качественный и количественный состав дрожжей в гомогенатах 20 изученных насекомых отражен в табл. 1. Видно, что дрожжевые сообщества двух видов мух контрастно различаются.

Дрожжевые сообщества, ассоциированные с *Fucellia fucorum*. У *F. fucorum* (вида, развивающегося в разлагающихся водорослях) дрожжи обнаружены в гомогенатах всех 10 особей в количестве от 0.7×10^3 до 2.9×10^3 КОЕ на муху (в среднем 1.6×10^3). Выделенные изоляты дрожжей отнесены к четырем видам.

1) *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder, Kreger-van Rij, 1952. Этот вид обнаружен у всех 10 особей. На его долю приходится от 0.8 до 97.0% общего числа колониеобразующих единиц, в среднем

Таблица 1. Состав дрожжевой микробиоты мух *F. fucorum* и *P. fumosa*

Вид мушки	Средняя численность (КОЕ на мушку ± стандартная ошибка среднего)	Средняя доля вида дрожжей (% от общего числа КОЕ) ± стандартная ошибка среднего						
		<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Dothiora prunorum</i>	<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	<i>Metschnikowia zobellii</i>	<i>Pichia kluyveri</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Fucellia fucorum</i>	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^3$	25.9 ± 10.1	51.7 ± 11.7	0.14*	22.2 ± 7.9	0	0	0
<i>Paracoenia fumosa</i> **	$(8.5 \pm 3.0) \times 10^4$	0	0	0	0	48.3 ± 17.30	51.6 ± 17.3	0.09*

* Встречается только в одном образце. ** Среднее рассчитано для 7 особей, у которых обнаружены дрожжи.

25.9%. Данный вид отличается высокой осмо-
лентностью и солевыносливостью; встречается
в морской воде, почве, плодах, вине, пиве, сыре и
других пищевых продуктах, в том числе с высо-
ким содержанием сахара (Breuer, Harms, 2006).
Эти дрожжи, которые также встречались в ассо-
циации с дрозофилидами и термитами, являются
одним из доминирующих компонентов дрожжево-
го микробиома муравьев *Formica aquilonia* Yarrow,
1955 (сем. *Formicidae*) (Hoang et al., 2015; Макси-
мова и соавт., 2016; Stefanini, 2018). Данный вид
присутствует в литоральных биотопах Белого мо-
ря, но не является массовым (Kachalkin, 2014), од-
нако очень часто встречается на других природ-
ных субстратах на территории ББС (Babjeva,
Reshetova, 1998, Kachalkin et al., 2017).

2) *Dothiora prunorum* (C. Dennis, Buhagiar)
Crous, 2016. Вид обнаружен у 9 особей из 10 и со-
ставляет от 8.3 до 93.0% общей численности
дрожжей, в среднем 51.7%. Вид *D. prunorum* был
выделен с поверхности плодов сливы домашней.
Представители рода *Dothiora* ранее не встреча-
лись в прибрежных биотопах Белого моря
(Kachalkin, 2014), но представители данного рода
были отмечены для лишайников на территории
ББС (Kachalkin et al., 2017). По-видимому, не ха-
рактерен для них и симбиоз с насекомыми (Ste-
fanini, 2018).

3) *Metschnikowia zobellii* (van Uden, Castelo-
Branco) van Uden, 1962. Вид обнаружен у всех 10
особей; на его долю приходится от 2.3 до 57.7%
общей численности, в среднем 22.2%. Данный
вид типичен для северных морей и доминирует в
водорослевых выбросах литорали Белого моря.
Он встречается как на бурых (*Fucus vesiculosus* L.,
1753, *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis, 1863, *Sac-
charina latissima* (L.) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl,
G.W. Saunders, 2006), так и на красных (*Odonthalia
dentate* (L.) Lyngbye, 1819) водорослях (Kachalkin,
2014). Все названные виды водорослей присут-
ствуют в выбросах, где развиваются личинки *F. fu-*

corum, в том числе в районе Кузокоцкого мыса,
где был собран материал.

4) *Metschnikowia bicuspidata* (Metschnikoff) Ka-
mienski, 1899. Вид обнаружен только у одной из
десяти особей *F. fucorum*, у которой он составляет
лишь 1.4% дрожжевого сообщества по числу КОЕ
(в среднем по всем 10 особям — 0.14%). Ранее дан-
ный вид был отмечен на беломорской литорали
на красных водорослях *O. dentate* (Kachalkin,
2014). Некоторые виды *Metschnikowia* иногда
встречаются в ассоциации с насекомыми, в том
числе дрозофилидами (Stefanini, 2018), однако
для видов *M. zobellii* и *M. bicuspidata* нам не уда-
лось найти таких данных, но известно, что они
являются паразитами ракообразных (Kachalkin,
2014).

**Дрожжевые сообщества, ассоциированные с
Paracoenia fumosa.** У *P. fumosa* (вида насекомых,
развивающихся в соленых лагунах и лужах) дрож-
жевые комплексы оказались принципиально ины-
ми. Дрожжи обнаружены лишь у семи из десяти
индивидов; в гомогенатах трех мух дрожжей обна-
ружить не удалось. У особей, в чьих гомогенатах
были найдены дрожжи, их численность варьирует
на три порядка: от 2.1×10^2 до 2.09×10^5 КОЕ на
муху (в среднем 8.5×10^4 ; для всех 10 особей —
 5.9×10^4). Идентифицировано три вида дрожжей,
только один из которых ранее был отмечен для
беломорской литорали (Kachalkin, 2014).

1) *Pichia kluyveri* Bedford ex Kudryavtsev, 1960.
Вид обнаружен у шести особей, у которых он со-
ставляет от 1.0 до 100% общей численности (в
среднем 56.4%, если учитывать только эти шесть
особей). Данный вид дрожжей часто встречается
в различных сбраживаемых растительных суб-
стратах, используется в виноделии и известен
способностью многих штаммов продуцировать
антигрибные токсины (Pintar, Starmer, 2003).

2) *Pichia kudriavzevii* Boidin, Pignal, Besson,
1965. Вид обнаружен у пяти особей, у которых он
составляет от 20.0 до 99.4% общей численности, в

среднем 72.3%. В окрестностях ББС данный вид ранее был найден на поверхности ягод (Babjeva, Reshetova, 1998). *P. kudriavzevii* встречается на различных плодах и в сбраживаемых растительных субстратах (Chan et al., 2012). Оба вида *Pichia*, обнаруженные в гомогенатах мух *P. fumosa*, ранее встречались в ассоциации с дрозофилидами (Stefanini, 2018) и другими двукрылыми, чьи личинки развиваются в сбраживаемых растительных субстратах (Deutscher et al., 2017).

3) *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen, 1883. Вид обнаружен лишь у одной особи, у которой он составляет 0.6% от общего числа КОЕ. Этот широко распространенный вид дрожжей лишь изредка встречается в кишечнике или на поверхности тела дрозофилид (а также некоторых перепончатокрылых), по-видимому, не образуя с ними устойчивых ассоциаций (Hoang et al., 2015; Stefanini, 2018). Возможно, данный компонент микробиоты является артефактом. *S. cerevisiae* часто рассматривают как синантропный вид, встречающийся в местах, связанных с пищевыми и прочими производствами. Данный вид встречается в природе, но чаще всего в районах произрастания винограда и других сочных высокосахаристых плодов, а на Белое море (вблизи ББС), скорее всего, попал благодаря человеку.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, комплексы дрожжей, ассоциированные с мухами *F. fucorum*, отличаются относительным постоянством численности и видового состава. Из четырех обнаруженных видов дрожжей три (*D. hansenii*, *M. zobellii*, *M. bicuspidata*) являются типичными для беломорской литорали, но только для одного из них (*D. hansenii*) имеются литературные данные о симбиозе с насекомыми (Hoang et al., 2015; Максимова и соавт., 2016; Stefanini, 2018). Однако *M. zobellii* и *M. bicuspidata* паразитируют на ракообразных, обитающих как в соленых, так и в пресных водах (van Uden, Castelo-Branco, 1961; Chen et al., 2007). Попадая в пищеварительный тракт ракообразного, игольчатые аксоспоры этих дрожжей перфорируют стенку кишечника, проникают в полость тела и прорастают. Нет сведений, что указанные виды также паразитируют на насекомых, но есть другие виды рода *Metschnikowia* Kamienski, 1899, паразитирующие на короедах (Weiser et al., 2003), поэтому паразитическую природу обнаруженных у мух *F. fucorum* дрожжей также не стоит исключать.

Комплексы дрожжей, ассоциированные с мухами *P. fumosa*, напротив, имеют крайне переменчивую численность. Из двух видов дрожжей, массово встречающихся в гомогенатах *P. fumosa*, только *P. kudriavzevii* ранее был найден в прибрежных биотопах Белого моря. Оба вида дрожжей типичны для разнообразных растительных субстра-

тов, подверженных брожению, и встречаются в кишечнике и на поверхности тела дрозофилид и других двукрылых, чьи личинки развиваются в таких субстратах.

Контрастные различия дрожжевых комплексов двух видов литоральных двукрылых могут быть связаны с различиями в условиях развития и образе жизни личинок.

Для вида *P. fumosa* в качестве местообитаний указываются не только солоноватые, но и пресные водоемы (Drake, 2006). Кроме того, имаго ряда видов рода *Paracoenia* Cresson, 1935 отмечены вблизи минеральных, горячих и сероводородных источников (Ferrag, 1987). Они встречаются как на плавающих водорослевых матах, в толще которых развиваются их личинки, так и на поверхности илистых отложений и гниющих остатков растений вблизи уреза воды с характерным запахом сероводорода. По сообщениям некоторых авторов (Petersen, Wiegert, 1982), личинки первого возраста североамериканских видов *P. bisetosa* (Coquillett, 1902) и *P. turbida* (Curran, 1927) питаются фекалиями имаго и личинок старших возрастов. Такой тип питания не был отмечен для личинок *P. fumosa*, но подобных исследований с этим видом и не проводили.

Личинки мух *P. fumosa*, пойманные для настоящего исследования, развиваются в илистых отложениях и гниющих остатках растений с характерным запахом сероводорода, то обнаженных, то покрытых водой во время прилива. Имаго чаще замечены на поверхности воды вблизи указанных мест. Таким образом, имаго не всегда имеют непосредственный доступ к кормовым субстратам личинок, а их возможности по распространению дрожжей, развивающихся в этих субстратах (и потенциально полезных для личинок), ограничены. В данном случае вряд ли можно ожидать устойчивую “наследуемость” микробиома.

Поэтому взаимоотношения имаго *P. fumosa* с дрожжами, возможно, носят оппортунистический, “необязательный” характер и могут варьировать, например, в зависимости от уровня воды над илистым субстратом и других изменяющихся факторов. Этим могут объясняться как резкие различия в численности дрожжей у разных особей, так и присутствие видов дрожжей, характерных не для литоральных биотопов, а для плодов растений и других неморских растительных субстратов. Отметим, что проведенная проверка солеустойчивости культур показала, что выделенные штаммы *P. kluyveri* и *P. kudriavzevii* способны к росту на среде с 10% NaCl, а *S. cerevisiae* дает нормальный рост при 7% NaCl. Таким образом, полученные результаты показывают способность дрожжей, ассоциированных с *P. fumosa*, к обитанию в морской воде при достаточном количестве доступных питательных веществ.

Напротив, все виды рода *Fucellia* Robineau-Desvoidy, 1842, биология которых известна, развиваются в выбросах морских водорослей (Ferrar, 1987), и их связь с солоноватыми субстратами постоянна. Личинки *F. fucorum*, в отличие от *P. fumosa*, развиваются не в водной среде, а в водорослевых выбросах в верхней части литорали и супралиторали, то есть в субстратах, вполне доступных для имаго и регулярно посещаемых ими. Поэтому неудивительно, что в гомогенатах мух *F. fucorum* обнаруживаются дрожжи, характерные для водорослей (*M. zobellii*, *M. bicuspidata*). Интересно, что в состав дрожжевого микробиома *F. fucorum* помимо “морских” видов входят также виды, нетипичные для водорослевых выбросов или, по крайней мере, не доминирующие в них. Для одного из них (*D. hansenii*) показана, во-первых, высокая осмо-толерантность и солевыносливость, во-вторых, склонность образовывать специфические ассоциации с насекомыми (дрозофилидами, термитами, муравьями). Взаимоотношения мух *F. fucorum* с дрожжами *D. hansenii*, несомненно, заслуживают дальнейшего изучения.

Ранее было показано, что лабораторные линии *D. melanogaster*, адаптирующиеся к соленому кормовому субстрату в ходе эволюционного эксперимента (Дмитриева и соавт., 2016), отличаются от контрольных линий, содержащихся на стандартном несоленом корме, по численности и видовому составу сопутствующих дрожжей (Ивницкий и соавт., 2018). При этом штаммы дрожжей, характерные для адаптированных к соли линий, вносят вклад в адаптацию к соленому корму. У адаптированных к соли дрозофил идентифицированы следующие виды дрожжей: *Starmerella bacillaris* (доминирующий вид, по-видимому, вносящий наибольший вклад в успешную адаптацию дрозофил к соленому корму), *Pichia membranifaciens* (E.C. Hansen) E.C. Hansen, 1904, *P. occidentalis* (Kurtzman, M.J. Smiley, C.J. Johnson) Kurtzman, Robnett, Basehoar-Powers, 2008, *Candida californica* (Mrak, McClung ex K.W. Anderson, C.E. Skinner) F.Y. Bai, Z.W. Wu, V. Robert, 2006. В контрольных линиях преобладают виды *Zygosaccharomyces bailii* (Lindner) Guillierm, 1912, *P. membranifaciens* и *P. occidentalis* (Ивницкий и соавт., 2018; Dmitrieva et al., 2019). Ни один из видов дрожжей, зарегистрированных в ходе эволюционного эксперимента у *D. melanogaster*, в том числе в линиях, содержащихся на соленом кормовом субстрате, не был нами обнаружен у мух литорали Белого моря, личинки которых развиваются в соленых субстратах.

Полученные результаты в целом не противоречат гипотезе о том, что симбиотические дрожжи, переносимые двукрылыми на поверхности тела и в кишечнике, могут вносить вклад в адаптацию двукрылых к соленым субстратам (хотя и не дают веских новых подтверждений этой гипотезе). Если такой вклад существует, то следует

признать, что виды дрожжей, рекрутируемые в ходе адаптации к соленому субстрату, могут быть совершенно разными в разных случаях. Действительно, в трех рассмотренных примерах (*F. fucorum*, *P. fumosa* и адаптированные к соли лабораторные линии *D. melanogaster*) у адаптированных к соли популяций не нашлось ни одного общего вида дрожжей. Возможно, это указывает на высокую пластичность взаимоотношений между дрожжами и мухами в ходе адаптации последних к различным субстратам. В некоторых исследованиях отмечается, что состав дрожжевой микробиоты сильно зависит от субстрата (это могут быть грибы, кактусы, фиго и т.д.), используемого дрозофилами (Ganter, 2006). Это соответствует классическим представлениям, в рамках которых симбиоз между дрожжами и мухами рассматривается как “свободный” или “нестрогий” (loose symbiosis; Hammond, 1939). С другой стороны, контрастно различающиеся дрожжевые комплексы двух видов литоральных мух, описанные в данной работе, возможно, указывают также на высокую специфичность взаимоотношений, по крайней мере, некоторых двукрылых с определенными видами дрожжей. Показательным примером являются сложившиеся сообщества в пустыне Сонора, где определенные виды дрожжей ассоциированы с определенными видами дрозофил, которые в свою очередь приспособлены к жизни на определенных видах кактусов (Starmer, Fogelman, 1986). Для более глубокого понимания природы взаимоотношений двукрылых и дрожжей, их устойчивости, эволюции и роли в освоении соленых субстратов необходимы дальнейшие исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 18-04-00915).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Глушакова А.М., Качалкин А.В., Чернов И.Ю. Особенности динамики эпифитных и почвенных дрожжевых сообществ в зарослях недотроги железистой на перегнойно-глеевой почве // Почвоведение. 2011. № 8. С. 966–972.
- Glushakova A.M., Kachalkin A.V., Chernov I.Y. Specific features of the dynamics of epiphytic and soil yeast communi-

- ties in the thickets of Indian balsam on mucky gley soil // *Euras. Soil Sci.* 2011. V. 44. P. 886–892.
- Дмитриева А.С., Ивницкий С.Б., Марков А.В. Адаптация *Drosophila melanogaster* к неблагоприятному кормовому субстрату сопровождается расширением трофической ниши // *Журн. общей биологии.* 2016. Т. 77. С. 249–261.
- Ивницкий С.Б., Максимова И.А., Панченко П.Л., Дмитриева А.С., Качалкин А.В., Корнилова М.Б., Перфильева К.С., Марков А.В. Роль микробиома в адаптации *Drosophila melanogaster* к кормовому субстрату с повышенной концентрацией NaCl // *Журн. общей биологии.* 2018. Т. 79. С. 393–403.
- Качалкин А.В., Глушакова А.М., Панкратов Т.А. Дрожжевое население лишайников полуострова Киндо // *Микробиология.* 2017. Т. 86. С. 762–769.
- Kachalkin A.V., Glushakova A.M., Pankratov T.A. Yeast population of the Kindo Peninsula lichens // *Microbiology (Moscow).* 2017. V. 86. P. 786–792.
- Максимова И.А., Глушакова А.М., Качалкин А.В., Чернов И.Ю., Пантелеева С.Н., Резникова Ж.И. Дрожжевые сообщества муравейников *Formica aquilonia* // *Микробиология.* 2016. Т. 85. С. 100–106.
- Maksimova I.A., Glushakova A.M., Kachalkin A.V., Chernov I.Y., Panteleeva S.N., Reznikova Z.I. Yeast communities of *Formica aquilonia* colonies // *Microbiology (Moscow).* 2016. V. 85. P. 124–129.
- Панченко П.Л., Корнилова М.Б., Перфильева К.С., Марков А.В. Симбиотическая микробиота вносит вклад в адаптацию *Drosophila melanogaster* к неблагоприятной кормовой среде // *Изв. РАН. Сер. биол.* 2017. № 4. С. 341–351.
- Panchenko P.L., Kornilova M.B., Perfilieva K.S., Markov A.V. Contribution of symbiotic microbiota to adaptation of *Drosophila melanogaster* to an unfavorable growth medium // *Biol. Bull.* 2017. V. 44. № 4. P. 345–354.
- Anagnostou C., Dorsch M., Rohlf M. Influence of dietary yeasts on *Drosophila melanogaster* life-history traits // *Entomol. Exp. Appl.* 2010. V. 136. P. 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2010.00997.x>
- Babjeva I., Reshetova I. Yeast resources in natural habitats at polar circle latitude // *Food Technol. Biotechnol.* 1998. Special iss. Yeast Nutrition and Natural Habitat. V. 36. P. 1–5.
- Becher P.G., Flick G., Rozpedowska E., Schmidt A., Hagman A., Lebreton S., Larsson M.C., Hansson B.S., Piškur J., Witzgall P., Bengtsson M. Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development // *Functional Ecology.* 2012. V. 26. P. 822–828.
- Bordenstein S.R., Theis K.R. Host biology in light of the microbiota: ten principles of holobionts and hologenomes // *PLoS Biol.* 2015. V. 13. Article e1002226.
- Breuer U., Harms H. *Debaryomyces hansenii* – an extremophilic yeast with biotechnological potential // *Yeast.* 2006. V. 23. P. 415–437.
- Brummel T., Ching A., Seroude L., Simon A.F., Benzer S. *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 12974–12979.
- Chan G.F., Gan H.M., Ling H.L., Rashid N.A.A. Genome sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a potential producer of bioethanol and phytase // *Eukaryot. Cell.* 2012. V. 11. P. 1300–1301.
- Chen S.C., Chen Y.C., Kwang J., Manopo I., Wang P.C., Chaung H.C., Liaw L.L., Chiu S.H. *Metschnikowia bicuspidata* dominates in Taiwanese cold-weather yeast infections of *Macrobrachium rosenbergii* // *Dis. Aquat. Organ.* 2007. V. 75. P. 191–199.
- Coluccio A.E., Rodriguez R.K., Kernan M.J., Neiman A.M. The yeast spore wall enables spores to survive passage through the digestive tract of *Drosophila* // *PLoS One.* 2008. V. 3. Article e2873.
- Deutscher A.T., Reynolds O.L., Chapman T.A. Yeast: An overlooked component of *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae) larval gut microbiota // *J. Econ. Entomol.* 2017. V. 110. P. 298–300.
- Dmitrieva A.S., Ivitsky S.B., Maksimova I.A., Panchenko P.L., Kachalkin A.V., Markov A.V. Symbiotic yeasts affect adaptation of *Drosophila melanogaster* to food substrate with high NaCl concentration // *PLoS One.* 2019. V. 14. № 11. e0224811.
- Dobson T. Seaweed flies (Diptera: Coelopidae, etc.) // *Marine Insects.* Amsterdam / Ed. Cheng L. Oxford: North Holland Publishing Company, N.Y.: Elsevier, 1976. P. 447–464.
- Drake C.V. British *Ephydriidae* (Diptera). 2006. 49 p. URL: [https://www.diptera-in-beeld.nl/Ref-Key%20Ephydriidae%20British%20key%20-%20new%20\(2006\)-C.M.Drake.pdf](https://www.diptera-in-beeld.nl/Ref-Key%20Ephydriidae%20British%20key%20-%20new%20(2006)-C.M.Drake.pdf)
- Ferrar P. A Guide to the breeding habits and immature stages of Diptera Cyclorrhapha // *Entomograph* / Leiden-Copenhagen: E.J. Brill. Scandinavian Science Press, 1987. V. 8. Part 1. 477 p.
- Erkosar B., Storelli G., Defaye A., Leulier F. Host-intestinal microbiota mutualism: “learning on the fly” // *Cell Host Microbe.* 2013. V. 13. P. 8–14.
- Ganter P.G. Yeast and invertebrate associations // *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* / Eds. Rosa C., Peter G. N.Y.: Springer, 2006. P. 303–370.
- Hammond E.C. Biological effects of population density in lower organisms (concluded) // *The Quarterly Review of Biology.* 1939. V. 14. № 1. P. 35–59.
- Herbst D.B. Comparative population ecology of *Ephydriidae* Say (Diptera: Ephydriidae) at Mono Lake (California) and Abert Lake (Oregon) // *Hydrobiol.* 1988. V. 158. P. 145–166.
- Hoang D., Kopp A., Chandler J.A. Interactions between *Drosophila* and its natural yeast symbionts – Is *Saccharomyces cerevisiae* a good model for studying the fly-yeast relationship? // *Peer J.* 2015. V. 3. Article e1116.
- Kachalkin A.V. Yeasts of the White Sea intertidal zone and description of *Glaciozyma litorale* sp. nov. // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2014. V. 105. P. 1073–1083.
- Lee W.-J., Brey P.T. How microbiomes influence metazoan development: insights from history and *Drosophila* modeling of gut-microbe interactions // *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 2013. V. 29. P. 571–592.
- Margulis L., Fester R. Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation: Speciation and Morphogenesis. Boston: MIT Press, 1991. 470 p.
- Petersen C.E., Wiegert R.G. Coprophagous nutrition in a population of *Paracoenia bisetosa* (Ephydriidae) from Yellowstone national Park // *Oikos.* 1982. V. 39. P. 251–255.
- Pintar J., Starmer W.T. The costs and benefits of killer toxin production by the yeast *Pichia kluyveri* // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2003. V. 83. P. 89–97.

- Stamps J.A., Yang L.H., Morales V.M., Boundy-Mills K.L. *Drosophila* regulate yeast density and increase yeast community similarity in a natural substrate // PLoS One. 2012. V. 7. Article e42238.
- Starmer W.T., Fogelman J.C. Coadaptation of *Drosophila* and yeasts in their natural habitat // J. Chem. Ecol. 1986. V. 12. P. 1037–1055.
- Stefanini I. Yeast-insect associations: It takes guts // Yeast. 2018. V. 35. P. 315–330.
- Stergiopoulos K., Cabrero P., Davies S.A., Dow J.A. Salty dog, an SLC5 symporter, modulates *Drosophila* response to salt stress // Physiol. Genomics. 2009. V. 37. P. 1–11.
- Storelli G., Defaye A., Erkosar B., Hols P., Royet J., Leulier F. *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing // Cell Metab. 2011. V. 14. P. 403–414.
- Te Velde J.H., Molthoff C.F.M., Scharloo W. The function of anal papillae in salt adaptation of *Drosophila melanogaster* larvae // J. Evol. Biol. 1988. V. 2. P. 139–153.
- Trinder M., Daisley B.A., Dube J.S., Reid G. *Drosophila melanogaster* as a high-throughput model for host–microbiota interactions // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Article 751.
- van Uden N., Castelo-Branco R. *Metschnikowia zobellii* sp. nov. and *M. krissii* sp. nov., two yeasts from the Pacific Ocean pathogenic for *Daphnia magna* // J. Gen. Microbiol. 1961. V. 26. P. 141–148.
- Waddington C.H. Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters // Nature. 1959. V. 183. P. 1654–1655.
- Weiser J., Wegensteiner R., Händel U., Žižka Z. Infections with the ascomycete fungus *Metschnikowia typographi* sp. nov. in the Bark Beetles *Ips typographus* and *Ips amitinus* (Coleoptera, Scolytidae) // Folia Microbiol. 2003. V. 48. P. 611–618.

Yeast Communities Associated with *Diptera* of the White Sea Littoral

I. A. Maksimova¹, A. V. Kachalkin^{1,2}, E. Yu. Yakovleva^{1,*}, M. G. Krivosheina³, and A. V. Markov^{1,3}

¹Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

²Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

³Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

⁴Borissiak Paleontological Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: e.u.yakovleva@gmail.com

Received July 18, 2019; revised September 10, 2019; accepted November 29, 2019

Abstract—Relationship between symbiotic yeast and *Diptera* insects are studied mainly on fruit flies (*Drosophilidae*). Evolutionary experiments showed that changes in the composition of the yeast microbiota vectored by flies in their gut and on the body surface contributes to the adaptation of laboratory *Drosophila* populations to the high-salt growth medium. Although saline substrates are not commonly used by *Drosophilidae* in nature, species adapted to such substrates are known in other families of *Diptera*. Yeast communities associated with these species are studied insufficiently. This is the first report on the yeast communities associated with two *Diptera* species living near the White Sea, *Paracoenia fumosa* (Stenhammar, 1844) (*Ephydriidae*) and *Fucellia fucorum* (Fallén, 1819) (*Anthomyiidae*). Their larvae develop in the coastal saline lagoons and in algae driven ashore. The *P. fumosa* yeast microbiota includes opportunistic species *Pichia kluyveri* Bedford ex Kudryavtsev, 1960 and *P. kudriavzevii* Boidin, Pignal, Besson, 1965 and is characterized by its highly variable abundance (the number of colony-forming units varies widely in different individuals). *F. fucorum* is characterized by a more stable yeast community, including species common in White Sea algae and coastal waters (*Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder, Kreger-van Rij, 1952, *Metschnikowia zobellii* (van Uden, Castelo-Branco) van Uden, 1962, and *M. bicuspidata* (Metschnikoff) Kamienski, 1899). These two species of littoral flies shared no common yeast species. Moreover, none of the yeast species found in the littoral flies was detected in the evolutionary experiment on the adaptation of *Drosophila* to the high-salt growth medium (the similarity is limited only to the *Pichia* genus level). Contrasting differences in the yeast microbiome of two ecologically similar littoral species of *Diptera* may indicate, on the one hand, specificity, and, on the other, evolutionary plasticity of the relationship between salt-tolerant flies and yeast.

Keywords: symbiotic yeasts, *Diptera*, adaptation to saline substrates, littoral