

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Лютова Людмила Владимировна

**ТАКСОНОМИЯ И ЭВОЛЮЦИОННАЯ ГЕНЕТИКА
ДРОЖЖЕЙ *KLUYVEROMYCES LACTIS***

Специальности 1.5.18. – микология,
1.5.7. – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики дрожжей Центра геномных исследований «Курчатовский геномный центр» Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий, и на кафедре микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

**Научные
руководители:**

*Наумова Елена Сергеевна, доктор биологических наук,
профессор*

*Шнырёва Алла Викторовна, доктор биологических наук,
старший научный сотрудник*

**Официальные
оппоненты:**

Громовых Татьяна Ильинична, доктор биологических наук, профессор кафедры ХимБиотех Федерального государственного автономного учреждения высшего образования «Московский политехнический университет»

Галкин Алексей Петрович, доктор биологических наук, доцент, директор Санкт-Петербургского филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Качалкин Алексей Владимирович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории почвенной микробиологии, кафедра биологии почв, факультет почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «17» мая 2024 г. в 17 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.6 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический факультет МГУ, аудитория М-1.

E-mail: dissovet_00155@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/2975>

Автореферат разослан «__» апреля 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Д.М. Гершкович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности.

Молочные дрожжи вида *Kluveromyces lactis* являются вторым, после *Saccharomyces cerevisiae*, объектом фундаментальных и прикладных исследований. Дрожжи *K. lactis* имеют большое биотехнологическое значение для производства гетерологичных белков медицинского и пищевого значения, а благодаря продуцированию киллерных токсинов могут подавлять развитие вредных микроорганизмов (Spohner et al., 2016).

В отличие от большинства видов дрожжей *K. lactis* и родственный вид *K. marxianus* способны утилизировать дисахарид лактозу, расщепляя его до моносахаридов глюкозы и галактозы, благодаря наличию внутриклеточного фермента β -галактозидазы (КФ 3.2.1.23). По существу, *K. lactis* и *K. marxianus* являются естественными продуцентами фермента β -галактозидазы, который используется в пищевой промышленности для производства различных молочных продуктов, включая безлактозные, что важно для людей с непереносимостью лактозы (Anisha, 2017). Способность разлагать лактозу также имеет большое значение для утилизации отходов молочной промышленности, которые представляют серьезную экологическую проблему (Sampaio et al., 2020). В этой связи, актуальным является создание штаммов *Kluveromyces*, которые наиболее полно утилизируют лактозу.

У дрожжей *Kluveromyces* способность ферментировать лактозу контролируется сложным локусом *LAC*, состоящим из тесно сцепленных структурных генов *LAC4* (ген β -галактозидазы) и *LAC12* (ген пермеазы лактозы), и регуляторной последовательности (Dickson et al., 1989). В последние годы активно изучаются гены *LAC* молочных дрожжей *K. marxianus* (Varela et al., 2017, 2019). Лактозные гены вида *K. lactis* мало изучены, а опубликованные данные касаются только одного штамма NRRL Y-1140. Таким образом, полиморфизм генов *LAC* дрожжей *K. lactis* не изучен.

Согласно современной классификации, вид *K. lactis* включает две таксономические разновидности: молочные дрожжи *K. lactis* var. *lactis* и неспособные утилизировать лактозу природные штаммы *K. lactis* var. *drosophilum*. Основанное только на фенотипических и экологических критериях разделение на разновидности является достаточно условным и не отражает существующей гетерогенности разновидности *K. lactis* var. *drosophilum*, продемонстрированной с помощью различных молекулярных методов (Ragnini, Fukuhara, 1988; Belloch et al., 1997, 2000, 2002; Naumov, Naumova, 2002). На основании гибридологического анализа и молекулярного кариотипирования, а также литературных данных, была проведена таксономическая ревизия вида *K. lactis* и предложено пять разновидностей: var. *lactis* (Lac^+) и неспособные утилизировать лактозу var. *drosophilum* (Северная Америка), var. *phaseolospora* (Северная Америка), var. *krassilnikovii* (Европа), var. *vanudenii* (Южная Африка) (Naumov, Naumova, 2002). Эта ревизия не была принята в последующих монографиях, посвященных систематике дрожжей рода *Kluveromyces* (Lachance, 2007, 2011). В качестве объяснения было отмечено, что условное деление только на две разновидности поддерживает преобладание в литературе, а дифференциация не усваивающих лактозу дрожжей *K. lactis* на четыре предложенные разновидности является неоднозначной.

Помимо *K. lactis*, род *Kluveromyces* включает виды *K. aestuarii*, *K. dobzhanskii*, *K. marxianus*, *K. nonfermentas*, *K. siamensis*, *K. wickerhamii* и *K. starmeri* (Kurtzman, 2003;

Lachance, 2007; Freitas et al., 2020). Виды *Kluuveromyces* различаются по способности утилизировать лактозу. *K. lactis* var. *lactis* и молочные штаммы *K. marxianus* способны ферментировать лактозу, а виды *K. aestuarii*, *K. siamensis*, *K. nonfermentans*, *K. wickerhamii* и природные изоляты *K. marxianus* ассимилируют лактозу, но не способны ее ферментировать из-за зависимость от дыхания транспорта лактозы (Наумов, 2006, 2008; Varela et al., 2019). Дрожжи *K. dobzhanskii*, *K. starmeri* и *K. lactis* var. *drosophilae* не утилизируют лактозу и не имеют даже последовательностей генов *LAC*. Остается неясным происхождение лактозных генов разновидности *K. lactis* var. *lactis*.

Цель и задачи исследования. Цель работы – изучение молекулярного полиморфизма, таксономии и эволюции дрожжей *K. lactis* на материале штаммов различного экологического и географического происхождения.

В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Определение таксономического статуса дивергентных природных популяций в пределах вида *K. lactis* и подбор молекулярных маркеров для их достоверной дифференциации.

2. Молекулярный скрининг генов *LAC*, контролирующих ферментацию лактозы, и их хромосомное картирование у дрожжей разновидности *K. lactis* var. *lactis*.

3. Рекомбинационный анализ генов *LAC* различной хромосомной локализации у дрожжей *K. lactis* var. *lactis*.

4. Сравнительный анализ β -галактозидаз и пермеаз лактозы видов рода *Kluuveromyces*.

5. Изучение происхождения локусов *LAC* молочных дрожжей *K. lactis* var. *lactis*. Молекулярно-генетический анализ межвидовых гибридов *K. marxianus* \times *K. lactis*.

6. Использование межштаммовой гибридизации для создания новых штаммов молочных дрожжей *K. lactis*, способных активно сбраживать лактозу.

Объект и предмет исследования. Штаммы дрожжей *Kluuveromyces lactis* различного экологического и географического происхождения.

Научная новизна и практическая значимость работы. На материале штаммов различного происхождения установлено, что способность дрожжей *K. lactis* var. *lactis* ферментировать лактозу контролируется тремя полимерными локусами *LAC* различной хромосомной локализации: *LAC1* (хромосома III), *LAC2* (хромосома II) и *LAC3* (хромосома IV). Впервые проведен филогенетический анализ β -галактозидаз и пермеаз видов рода *Kluuveromyces* и аминокислотных последовательностей этих ферментов у других родов дрожжей. Обнаружена корреляция между последовательностями генов *LAC* и экологическим происхождением штаммов *Kluuveromyces*: молочные продукты и природные источники. Группа молочных штаммов гетерогенна и включает виды *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus*, что указывает на общее происхождение их генов *LAC*. С помощью межвидовой гибридизации впервые продемонстрирована возможность переноса кластера лактозных генов *LAC4–LAC12* из молочного штамма *K. marxianus* в геном европейского природного *Lac* штамма *K. lactis* популяции «krassilnikovii».

С помощью различных молекулярных методов и гибридологического анализа впервые изучен внутривидовой полиморфизм дрожжей *K. lactis* на материале штаммов, выделенных из молочных продуктов и природных источников в разных регионах мира. Установлено, что вид *K. lactis* включает сбраживающие лактозу *K. lactis* var. *lactis* и

шесть генетически изолированных популяций не сбраживающих лактозу дрожжей *K. lactis*: «*drosophilorum*», «*phaseolosporus*», «*krassilnikovii*», «*pseudovanudenii*», «водная» и «восточная». Впервые изучены молекулярные кариотипы генетических популяций вида *K. lactis* и установлено, что все они имеют одинаковое гаплоидное число хромосом, равное шести. Рекомендовано использовать молекулярный маркер *ACT1* для достоверной идентификации и дифференциации внутривидовых популяций в пределах вида *K. lactis*.

Показано, что межштаммовая гибридизация является перспективным методом создания молочных штаммов *Kluveromyces*, способных активно ферментировать лактозу. Отобраны межштаммовые гибриды *K. lactis* var. *lactis* и молочные штаммы вида *K. marxianus*, обладающие наибольшей ферментационной активностью и представляющие интерес для дальнейших молекулярно-генетических исследований и селекционных разработок. Создана коллекция охарактеризованных молекулярными методами молочных и природных штаммов дрожжей *K. lactis*, которая может быть использована в фундаментальных и прикладных исследованиях.

Методология и методы исследования. Исследование проводилось с применением полифазного подхода, включая различные микробиологические, генетические и молекулярные методы. Культивирование дрожжей, получение и отбор ауксотрофных мутантов, гибридизацию и тетрадный анализ проводили согласно стандартным методикам (Захаров и др., 1984; Наумов, 1986).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Физиологическая разновидность *K. lactis* var. *drosophilorum* гетерогенна и представлена шестью генетически изолированными популяциями: «*drosophilorum*», «*phaseolosporus*», «*krassilnikovii*», «*pseudovanudenii*», «водная» и «восточная». На основании нуклеотидных последовательностей гена *ACT1* можно достоверно дифференцировать все популяции в пределах вида *K. lactis*.

2. У дрожжей *K. lactis* var. *lactis* способность ферментировать лактозу контролируется тремя полимерными локусами *LAC* различной локализации: *LAC1* (хромосома III), *LAC2* (хромосома II) и *LAC3* (хромосома IV). Филогенетический анализ выявил значительные различия между белками *LAC4* и *LAC12* видов рода *Kluveromyces* и последовательностями этих ферментов у дрожжей других родов.

3. Локусы *LAC* имеют общее происхождение у молочных дрожжей видов *K. lactis* и *K. marxianus*. Доместикация молочных дрожжей *K. lactis* var. *lactis*, по-видимому, произошла на основе приобретения генного кластера *LAC4-LAC12* от молочных штаммов *K. marxianus*. Наиболее вероятным реципиентом лактозного кластера были природные европейские штаммы популяции «*krassilnikovii*».

4. Межштаммовая гибридизация молочных дрожжей *K. lactis* var. *lactis* является эффективным методом создания перспективных производственных штаммов, способных активно сбраживать лактозу.

Личный вклад соискателя. Автором были самостоятельно проведены все экспериментальные научные исследования и анализ полученных результатов. Освоены и применены в работе методы молекулярной (ПЦР, пульс-электрофорез, Саузерн-блот и др.) и классической (гибридологический и рекомбинационный анализы) генетики, а также стандартные таксономические методы. Результаты проведённых исследований представлены автором на конференциях и оформлены в виде научных публикаций.

Степень достоверности результатов. Работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современных молекулярно-биологических, генетических и компьютерных методов исследования. Выводы и положения, сделанные в диссертационной работе, основаны на обширном экспериментальном материале, достоверны и обоснованы. Полученные результаты сравнивались с данными отечественных и зарубежных исследователей в сходном направлении.

Апробация работы. Основные результаты работы представлены на Международной конференции «XXXVII Annual Meeting of the European Culture Collections' Organisations ECCO 2018» (Москва); Всероссийской школе-конференции «Генетика микроорганизмов: от геномики к биоэкономике» (2018, Пушкино); Всероссийской конференции «Микология и альгология в России. XX-XXI век: смена парадигм» (2019, Москва); Международной конференции «VII Congress of Vavilov Society of Geneticists and Breeders and Associate Symposiums» (2019, Санкт-Петербург); Международной конференции «ISSY 35 The 35th International Specialized Symposium on Yeasts» (2019, Анталия, Турция); 3-ем Российском микробиологическом конгрессе (2021, Псков); 4-ом Российском микробиологическом конгрессе (2023, Томск).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них четыре статьи в журналах, рецензируемых в Scopus и Web of Science.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 153 страницах и включает 7 разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы. Работа содержит 35 рисунков, 10 таблиц. Список литературы включает 197 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В разделе приведены литературные данные по систематике дрожжей рода *Kluyveromyces*, рассмотрена история их классификации и дана краткая характеристика всех видов этого рода. Приведён обзор литературы, посвященный системе генов *LAC* ферментации лактозы, рассмотрено прикладное значение фермента β -галактозидазы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Изучено 107 штаммов дрожжей рода *Kluyveromyces*, выделенных из молочных продуктов и природных источников в разных регионах мира.

Методы исследования. Дрожжи культивировали на стандартной среде YPD при 28°C. Способность дрожжей ферментировать лактозу определяли согласно Наумова и др. (2018). Скорость сбраживания 10%-ной лактозы, галактозы, глюкозы и образование спирта определяли с помощью ВЭЖХ-анализа. Анализ проводили на жидкостном хроматографе HPLC-система Waters Alliance E2695 (США).

Дрожжевую ДНК выделяли согласно Lõoke et al. (2011). Полимеразную цепную реакцию осуществляли на ДНК-амплификаторе “Bio-Rad” (США). Нуклеотидную последовательность ПЦР-продуктов по двум цепям определяли прямым секвенированием по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе “Applied Biosystems 3730” (США). Поиск сходства с известными нуклеотидными последовательностями соответствующих генов и рДНК проводили с помощью программы BLAST в GenBank. Филогенетические деревья строили методом объединения соседей в программе MEGA 7 (Kumar et al., 2016).

Приготовление препаратов хромосомных ДНК и их электрофоретическое разделение проводили на аппарате CHEF-DR III (Bio-Rad, США) согласно Naumov et al. (1992). Перенос хромосомных ДНК на нитроцеллюлозную мембрану проводили вакуумным способом с помощью аппарата “Vacuum blotter” (“Bio-Rad”, США). Саузерн-гибридизацию осуществляли нерадиоактивным методом с использованием набора “DIG High Prime DNA Labeling Detection Starter Kit I” (“Roche”, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. ВНУТРИВИДОВОЙ ПОЛИМОРФИЗМ ДРОЖЖЕЙ *KLUYVEROMYCES LACTIS*: ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОПУЛЯЦИИ

Для изучения генетического внутривидового полиморфизма дрожжей *K. lactis* были использованы различные молекулярные методы и гибридологический анализ.

Проведен ПДРФ-анализ межгенного спейсера IGS2 рДНК с эндонуклеазой *AluI* для 67 штаммов *K. lactis*, выделенных из различных молочных продуктов и природных источников в разных регионах мира. По сходству *AluI*-профилей штаммы были разделены на восемь групп. Идентичные паттерны имели сбраживающие лактозу штаммы var. *lactis* и *K. vanudenii* ВКМ У-1535. Во вторую группу вошли европейские изоляты популяции «krassilnikovii» и среднеазиатские штаммы. Третья группа сформирована штаммами популяции «восточная». Еще пять групп образованы североамериканскими штаммами: популяции «drosophilorum», «новая», «phaseolosporus», «pseudovanudenii» и «водная». Название популяций приводится согласно Naumova et al. (2004).

Молекулярное кариотипирование. Для достижения оптимального разделения хромосомных ДНК штаммов *K. lactis* были использованы четыре режима кариотипирования, которые различались напряженностью электрического поля, временем переключения полей и продолжительностью электрофореза.

На рис. 1 приведена схема молекулярных кариотипов популяций *K. lactis*, составленная на основании нескольких электрофоретических гелей. Хромосомная ДНК изученных штаммов разделилась на 3–6 электрофоретических полос размером от 950 до 2900 т.п.н. Наименьший диапазон размеров хромосомных полос обнаружен у штаммов популяции «drosophilorum» (от 1600 до 2200 т.п.н.), а наибольший – у штаммов из Средней Азии (от 1000 до 2900 т.п.н.). Согласно интенсивности свечения окрашенных бромистым этидием электрофоретических полос некоторые из них содержат две хромосомы. Идентичные молекулярные кариотипы имеют молочные дрожжи var. *lactis* и европейские штаммы популяции «krassilnikovii», а также штаммы «drosophilorum» и «новая» (рис. 1). Для штаммов *K. vanudenii* ВКМ У-1535 и УСМ У-1891, УСМ У-1892 (Таджикистан) характерно наличие трех хромосомных полос в диапазоне 1000–1600 т.п.н., вместо двух как у штаммов var. *lactis* и европейских штаммов «krassilnikovii». Штаммы популяций «pseudovanudenii» и «восточная» были гомогенными по молекулярным кариотипам. С другой стороны, по два кариотипических профиля выявлено у штаммов популяций «phaseolosporus» и «водная» (рис. 1).

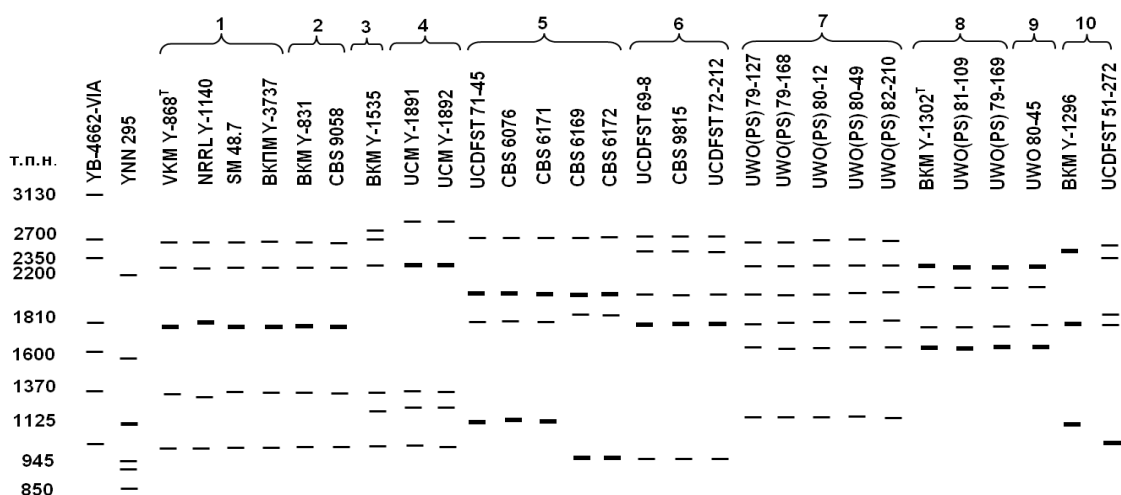


Рис. 1. Суммарная схема молекулярных кариотипов дрожжей *K. lactis*. 1 – var. *lactis*, 2 – «krassilnikovii», 3 – «vanudenii», 4 – «среднеазиатская», 5 – «водная», 6 – «восточная», 7 – «pseudovanudenii», 8 – «drosophilorum», 9 – «новая», 10 – «phaseolosporus». Размеры хромосомных полос (т.п.н.) приводятся по стандартным штаммам *Saccharomyces cerevisiae* YNN 295 и *Wickerhamomyces canadensis* YB-4662-VIA.

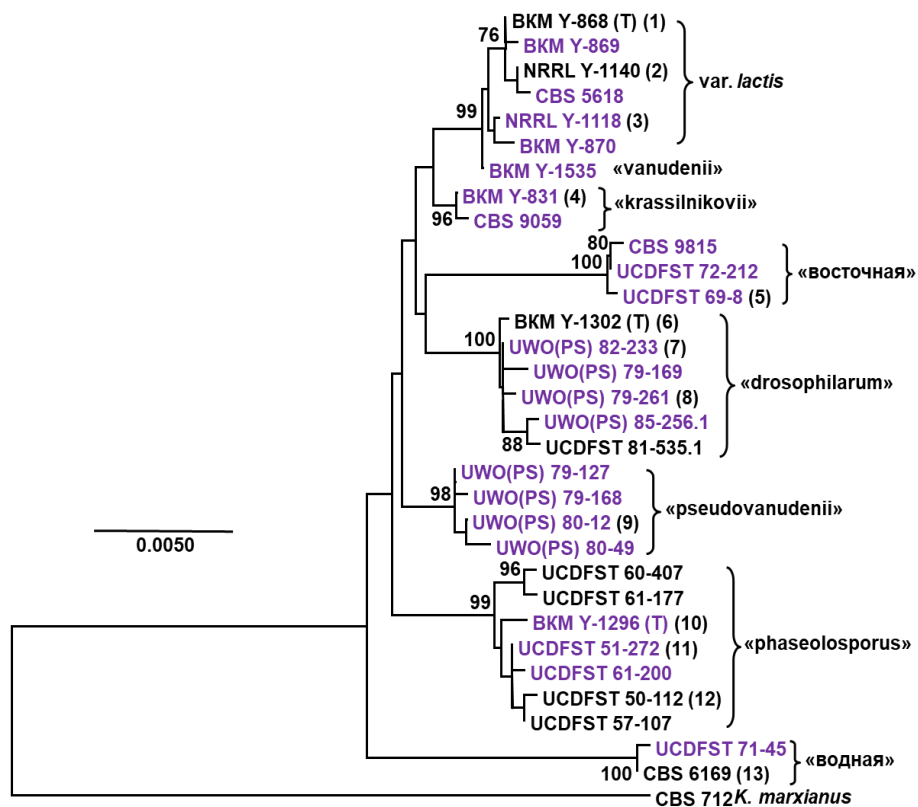
Таким образом, все изученные популяции *K. lactis* имеют одинаковое гаплоидное число хромосом, равное шести.

Мультигенный филогенетический анализ. Для установления филогенетического родства изученных штаммов мы провели сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей ITS-участка, *EF-1α* и *ACT1* генов, которые являются универсальными молекулярными маркерами для баркодинга ДНК дрожжей. На основании мультигенного филогенетического анализа изученные штаммы *K. lactis* распределились между 7 кластерами, имеющими ≥96% бутстреп поддержки (рис. 2). В первом кластере с 99%-ной статистической поддержкой объединились молочные штаммы var. *lactis* и Lac⁻ штамм *K. vanudenii* ВКМ Y-1535, имеющие идентичные последовательности гена *EF-1α*. Нуклеотидные последовательности остальных молекулярных маркеров также были идентичными или незначительно отличались: 1–2 нуклеотидные замены в гене *ACT1* и до шести – в ITS-участке. Второй кластер сформировали среднеазиатские изоляты и европейские штаммы популяции «krassilnikovii», имеющие идентичные ITS, *EF-1α* и *ACT1*-последовательности. Североамериканские штаммы распределились между четырьмя четко обособленными кластерами (98–100% бутстрепа). В одном кластере объединились штаммы популяций «drosophilorum» и «новая». Отдельные кластеры сформировали популяции «phaseolosporus», «pseudovanudenii» и «водная». Последняя популяция является наиболее дивергентной и отличается от всех остальных популяций *K. lactis* по нуклеотидным последовательностям всех трех молекулярных маркеров: шесть замен в ITS-участке, три в гене *EF-1α* и 12 замен в гене *ACT1*. Со 100% статистической поддержкой отдельный кластер сформировали штаммы популяции «восточная».

Сравнительный анализ дискриминационного потенциала использованных нами молекулярных маркеров показал, что последовательности гена *ACT1* являются наиболее вариабельными (до 44 нуклеотидных замен), что позволяет дифференцировать все популяции дрожжей *K. lactis* (рис. 3). Не утилизирующие лактозу популяции характеризуются тремя общими транзициями: T→C (121 и 484 позиции) и A→G (196 позиция).

Рис. 2.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей ITS-участка, *EF-1a* и *ACT1* генов популяций дрожжей *K. lactis*. Приводятся значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует пяти нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. В качестве внешней группы использовали типовую культуру *K. marxianus* CBS 712. Т – типовая культура. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов, имеющие идентичные нуклеотидные последовательности: 1 – CBS 1797, ВКМ Y-1527, ВКМ Y-1186, ВКМ Y-1333, ВКМ Y-1343; 2 – SM 48.7, ВКПМ Y-3737, ВКМ Y-1339; 3 – ВКМ Y-1868; 4 – CBS 9058, CBS 2877, CBS 2896, UCM Y-1891, UCM Y-1892; 5 – UCDFST 67-376; 6 – UCDFST 51-144, UCDFST 52-163, UCDFST 52-190, UCDFST 52-204; 7 – UWO(PS) 80-45; 8 – UWO(PS) 81-109; 9 – UWO(PS) 82-210; 10 – UCDFST 50-81; 11 – UCDFST 51-237; 12 – UCDFST 50-152; 13 – CBS 6076, CBS 6171, CBS 6172, UCDFST 71-47, UCDFST 71-52. Сиреневым цветом выделены последовательности, определённые в настоящей работе.



1 – CBS 1797, ВКМ Y-1527, ВКМ Y-1186, ВКМ Y-1333, ВКМ Y-1343; 2 – SM 48.7, ВКПМ Y-3737, ВКМ Y-1339; 3 – ВКМ Y-1868; 4 – CBS 9058, CBS 2877, CBS 2896, UCM Y-1891, UCM Y-1892; 5 – UCDFST 67-376; 6 – UCDFST 51-144, UCDFST 52-163, UCDFST 52-190, UCDFST 52-204; 7 – UWO(PS) 80-45; 8 – UWO(PS) 81-109; 9 – UWO(PS) 82-210; 10 – UCDFST 50-81; 11 – UCDFST 51-237; 12 – UCDFST 50-152; 13 – CBS 6076, CBS 6171, CBS 6172, UCDFST 71-47, UCDFST 71-52. Сиреневым цветом выделены последовательности, определённые в настоящей работе.

ACT1

	1	16	37	67	73	97	100	121	124	172	196	226	247	250	259	262	265	283	295	325	328	361	367	370	382
1. ВКМ Y-868 (Т)	С	С	Т	А	С	А	С	Т	Т	Т	А	С	С	Г	Т	С	С	С	Т	С	Т	С	Т	Т	С
2. ВКМ Y-1535	С
3. ВКМ Y-831	С	.	С	Г	С
4. UCM Y-1891	С	.	С	Г	С
5. ВКМ Y-1302 (Т)	.	.	.	Г	Т	.	.	С	.	Г	С	С	.	.	.
6. UWO(PS) 80-45	.	.	.	Г	Т	.	.	С	.	Г	С	С	.	.	.
7. ВКМ Y-1296 (Т)	Т	.	А	С	.	С	Г	.	Т	С	Т	А	.	.	.
8. UWO(PS) 80-49	Г	.	.	С	.	С	Г	С	.	С	.	.
9. UCDFST 71-45	Т	.	С	.	Г	Т	Т	А	Т	.	С	Т	С	Т	С	.
10. CBS 9815	.	Т	С	.	Г	Т	Т	.	.	С	Т	.	Т	.	Т

	394	400	424	448	457	484	490	505	507	574	595	607	616	631	661	673	772	832	925
1. ВКМ Y-868 (Т)	Г	С	Т	Г	С	Т	С	С	С	Т	Г	А	С	С	Т	А	С	Т	Т
2. ВКМ Y-1535
3. ВКМ Y-831	А	С
4. UCM Y-1891	А	С
5. ВКМ Y-1302 (Т)	.	.	С	.	.	С	.	.	Т	.	.	.	Т	С
6. UWO(PS) 80-45	.	.	С	.	.	С	.	.	Т	.	.	.	Т	С
7. ВКМ Y-1296 (Т)	.	Т	.	.	.	С	.	Т	Т	С
8. UWO(PS) 80-49	С	.	Т
9. UCDFST 71-45	С	Т	Т	Т	С	А	Г	.	.	.	Т	.	С	.
10. CBS 9815	.	.	С	А	Т	С	.	.	Т	Т	.	.

Рис. 3. Сравнительный анализ последовательностей гена *ACT1* различных популяций *K. lactis*: 1 – var. *lactis*; 2 – «vanudenii»; 3 – «krassilnikovii»; 4 – «среднеазиатская»; 5 – «drosophilorum»; 6 – «новая»; 7 – «phaseolosporus»; 8 – «pseudovanudenii»; 9 – «водная», 10 – «восточная». Выделены уникальные для каждой популяции нуклеотидные замены. Т – типовая культура. Нумерация последовательностей приводится согласно типовой культуре *K. lactis* ВКМ Y-868.

Штаммы популяции «krassilnikovii» и среднеазиатские изоляты имеют уникальную транзицию G→A в 394 позиции. У штаммов «drosophilorum» и «новая»

выявлено пять уникальных однонуклеотидных замен. Шесть уникальных замен обнаружено в *ACT1*-последовательностях популяции «phaseolosporus». Транзиции А→G (позиция 97) и Т→С (позиция 124) характерны для штаммов популяции «pseudovanudenii». Наибольшее количество уникальных замен (12) обнаружено в *ACT1*-последовательностях штаммов популяции «водная».

Таким образом, все семь генетических популяций можно дифференцировать на основании нуклеотидных последовательностей гена *ACT1*.

Гибринологический анализ. Использовали высокофертильные моноспоровые культуры гомоталлических штаммов и моноколониальные клоны гетероталлических дрожжей, у которых с помощью УФ-облучения были индуцированы различные ауксотрофные мутации. Генетическое родство штаммов определяли по жизнеспособности полового гибридного потомства (аскоспор) и рекомбинации контрольных маркеров ауксотрофности (табл. 1). Внутрипопуляционные гибриды var. *lactis* были высокофертильны, с выживаемостью аскоспор 84–97% и регулярной мейотической сегрегацией контрольных ауксотрофных маркеров (табл. 1, гибриды № Н1–Н4). Высокую выживаемость аскоспор (93%) также имел гибрид Н5 «krassilnikovii» × var. *lactis*. Хотя выживаемость аскоспор гибридов среднеазиатского штамма UCM Y-1891 с var. *lactis* NRRL Y-1140 и *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 была несколько ниже (76% и 64%), наблюдалась регулярная мейотическая сегрегация ауксотрофных маркеров (табл. 1, гибриды № Н6 и Н7). В то же время, гибрид № Н8 (UCM Y-1891 × ВКМ Y-1302 «drosophilaram») имел низкую выживаемость аскоспор: 16%. Ранее показано, что штамм ВКМ Y-1302 образует полустерильные гибриды со штаммами var. *lactis*, «krassilnikovii» и *K. vanudenii*: 6–45% (Naumov, Naumova, 2002).

Таким образом, установлено близкое генетическое родство среднеазиатских штаммов с группой штаммов var. *lactis*/«krassilnikovii»/*K. vanudenii*. Принимая во внимание идентичные *AluI*-профили, а также отсутствие различий по молекулярным маркерам ITS, *EF-1α* и *ACT1*, среднеазиатские штаммы относятся к популяции «krassilnikovii». Полученные результаты свидетельствуют о близком генетическом родстве штамма *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 и молочных дрожжей *K. lactis*. Ранее показано, что гибриды ВКМ Y-1535 × var. *lactis* имеют 71–85% выживаемости аскоспор (Naumov, Naumova, 2002). Геномный анализ дрожжей *K. lactis* подтверждает близкое генетическое родство *K. vanudenii* и var. *lactis* (Friedrich et al., 2023).

Мы суммировали результаты гибринологического анализа популяций дрожжей *K. lactis*, полученные в данной работе, и ранее опубликованные данные (рис. 4). По выживаемости гибридных аскоспор 7 популяций разделились на две группы. Штаммы var. *lactis* и «krassilnikovii» образуют фертильные гибриды (64–96%) с регулярной мейотической сегрегацией контрольных ауксотрофных маркеров. Во вторую группу попали штаммы четырех североамериканских популяций («drosophilaram», «phaseolosporus», «pseudovanudenii» и «водная») и популяция «восточная», образующие полустерильные гибриды: 0–26% выживаемости аскоспор. Гибриды между var. *lactis*/«krassilnikovii» и популяциями второй группы были стерильны или имели очень низкую выживаемость аскоспор (0–45%) и нерегулярное мейотическое расщепление ауксотрофных маркеров. У межпопуляционных гибридов с участием штаммов популяции «водная» двойные рекомбинанты (ab), как правило, отсутствовали, за исключением гибрида Н16 «водная» × «pseudovanudenii» (табл. 1).

Таблица 1. Тетрадный анализ внутри- и межпопуляционных гибридов *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* (NRRL Y-1118, NRRL Y-1140, ВКМ Y-1333, ВКМ Y-1339), «krassilnikovii» (CBS 9058), «vanudenii» (ВКМ Y-1535), «среднеазиатская» (УСМ Y-1891), «drosophilorum» (ВКМ Y-1302), «phaseolosporus» (ВКМ Y-1296), «водная» (UCDFST 71-45, CBS 6171), «восточная» (CBS 9815, UCDFST 69-8, UCDFST 72-212), «pseudovanudenii» (UWO(PS) 79-127)

№ гибрида	Гибриды	Число тетрад	Жизнеспособность спор, %	Расщепление* аВ:Ab:AB:ab	Генотипы гибридов
<i>var. lactis</i> × <i>var. lactis</i>					
H1	1118 (<i>lys</i>) × 1333 (<i>met9</i>)	82	91	11P : 8N : 39T	<i>MATa lys MET9/LYS met9</i>
H2	1140 (<i>his</i>) × 1333 (<i>met9</i>)	82	88	9P : 6N : 33T	<i>MATa his MET9/HIS met9</i>
H3	1118 (<i>lys</i>) × 1339 (<i>met5</i>)	85	84	9P : 5N : 19T	<i>MATa lys MET5/MATa LYS met5</i>
H4	1333 (<i>trp7</i>) × 1339 (<i>met5</i>)	43	97	10P : 6N : 24T	<i>trp7 MET5/MATa TRP7 met5</i>
«krassilnikovii» × <i>var. lactis</i>					
H5	9058 (<i>ura6-2</i>) × 1140 (<i>his</i>)	35	93	3P : 5N : 18T	<i>ura6-2 HIS/MATa URA6-2 his</i>
«среднеазиатская» × <i>var. lactis</i>					
H6	1891 (<i>ura</i>) × 1140 (<i>his</i>)	30	76	4P : 4N : 9T	<i>ura HIS/MATa URA his</i>
«среднеазиатская» × «vanudenii»					
H7	1891 (<i>ura</i>) × 1535 (<i>lys</i>)	25	64	3 : 14 : 28 : 19	<i>lys URA/LYS ura</i>
«среднеазиатская» × «drosophilorum»					
H8	1891 (<i>ura</i>) × 1302 (<i>his1</i>)	11	16	2:2:2:1	<i>ura HIS1/URA his1</i>
«водная» × «водная»					
H8	6171 (<i>ura</i>) × 71-45 (<i>ade4</i>)	46	51	20 : 22 : 23 : 27	<i>ura ADE4/URA ade4</i>
«восточная» × «восточная»					
H9	9815 (<i>cys,met</i>) × 69-8 (<i>ura</i>)	23	87	1P : 5N : 12T	<i>cys,met URA/CYS,MET ura</i>
«phaseolosporus» × «phaseolosporus»					
H10	1296 (<i>lys</i>) × 61-200 (<i>ura</i>)	24	63	2P : 2N : 4T	<i>lys URA/LYS ura</i>
«водная» × <i>var. lactis</i>					
H11	71-45 (<i>cys,met</i>) × 1118 (<i>lys</i>)	24	6	0 : 2 : 3 : 0	<i>cys,met LYS/CYS,MET lys</i>

Продолжение табл. 1.

«водная» × «drosophilarum»					
H12	71-45 (<i>ade4</i>) × 1302 (<i>arg1</i>)	40	2	1 : 2 : 0 : 0	<i>ade4 ARG1/ADE4 arg1</i>
H13	71-45 (<i>ade4</i>) × 1302 (<i>lys</i>)	27	5	2 : 3 : 0 : 0	<i>ade4 LYS /ADE4 lys</i>
«водная» × «phaseolusporus»					
H14	71-45 (<i>cys,met</i>) × 1296 (<i>arg1</i>)	22	11	0 : 6 : 4 : 0	<i>cys,met ARG1/CYS,MET arg1</i>
«водная» × «восточная»					
H15	71-45 (<i>ade4</i>) × 9815 (<i>his</i>)	20	15	4 : 4 : 4 : 0	<i>ade4 HIS/ADE4 his</i>
«водная» × «pseudovanudenii»					
H16	71-45 (<i>cys,met</i>) × 79-127 (<i>ura</i>)	20	6	0 : 2 : 1 : 2	<i>cys,met URA/CYS,MET ura</i>
«pseudovanudenii» × var. <i>lactis</i>					
H17	79-127 (<i>ura</i>) × 1140 (<i>his</i>)	18	18	5 : 6 : 1 : 1	<i>ura HIS/URA his</i>
H18	79-127 (<i>ura</i>) × 1118 (<i>lys</i>)	19	0	0 : 0 : 0 : 0	<i>ura LYS/URA lys</i>
«pseudovanudenii» × «drosophilarum»					
H19	79-127 (<i>ura</i>) × 1302 (<i>arg1</i>)	20	7	0 : 4 : 1 : 1	<i>ura ARG1/URA arg1</i>
H20	79-127 (<i>ura</i>) × 1302 (<i>his1</i>)	20	11	0 : 2 : 2 : 5	<i>ura HIS1/URA his1</i>
«pseudovanudenii» × «phaseolusporus»					
H21	79-127 (<i>ura</i>) × 1296 (<i>arg1</i>)	22	14	6 : 5 : 0 : 1	<i>ura ARG1/URA arg1</i>
«pseudovanudenii» × «восточная»					
H22	79-127 (<i>ura</i>) × 9815 (<i>his</i>)	35	26	15 : 9 : 8 : 5	<i>ura HIS/URA his</i>
«восточная» × «drosophilarum»					
H23	9815 (<i>his</i>) × 1302 (<i>arg1</i>)	20	14	4 : 3 : 4 : 0	<i>his ARG1/HIS arg1</i>
«восточная» × «phaseolusporus»					
H24	9815 (<i>his</i>) × 1296 (<i>trp1</i>)	20	0	0 : 0 : 0 : 0	<i>His TRP1/HIS trp1</i>
H25	72-212 (<i>ade</i>) × 1296 (<i>arg1</i>)	44	5	2 : 2 : 3 : 2	<i>ade ARG1/ ADE arg1</i>

* P, N, T – тетрады родительского, неродительского дитипов и тетратипа соответственно. a, b – ауксотрофности первого (до знака скрещиваемости) и второго родителя соответственно; A, B – прототрофности.

Даже в случае сравнительно высокой выживаемости полных тетрад (45%), отмеченной в некоторых комбинациях скрещиваний «*drosophilum*» × var. *lactis*, не наблюдалось рекомбинации родительских ауксотрофных маркеров (Naumov, Naumova, 2002). Все внутривидовые гибриды имели высокую выживаемость аскоспор (51–100%) и дигенную сегрегацию контрольных маркеров ауксотрофности.

Таким образом, комплексный вид *K. lactis* включает семь генетических популяций: var. *lactis*, «*drosophilum*», «*phaseolosporus*», «*krassilnikovii*», «*pseudovanudenii*», «водная» и «восточная». Можно заключить, что генетические *Lac* популяции дрожжей *K. lactis* имеют статус таксономических разновидностей.

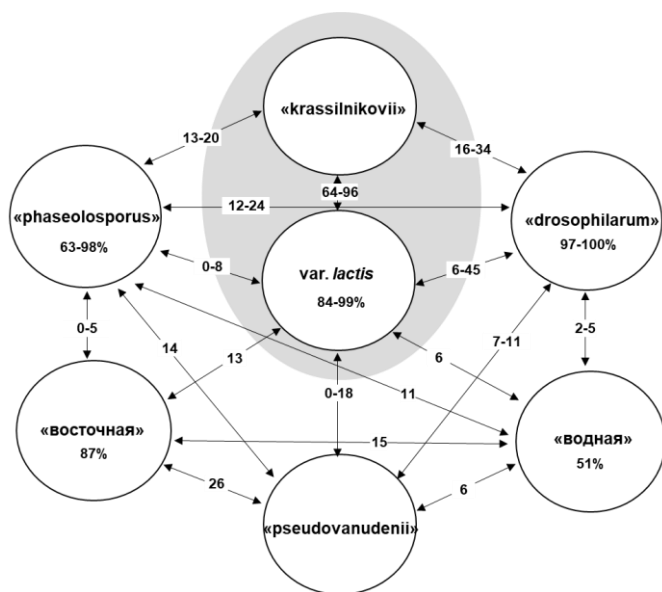


Рис. 4. Суммарные результаты гибридологического анализа генетических популяций дрожжей *K. lactis* (Naumov, Naumova, 2002; настоящее исследование).

2. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЛОКУСОВ *LAC* ДРОЖЖЕЙ *KLUYVEROMYCES*

С помощью полифазного подхода (применения методов пульс-электрофореза, Саузерн-гибридизации и секвенирования) мы провели изучение генов *LAC* у 33 сбраживающих лактозу штаммов *K. lactis* var. *lactis*, выделенных из молочных продуктов, почвы и клинических источников в различных регионах мира.



Рис. 5. Саузерн-гибридизация хромосомных ДНК дрожжей *K. lactis* var. *lactis* с зондом *LAC4*. Дорожки: K1 – *W. canadensis* (хромосомный стандарт); K2 – *S. cerevisiae* YNN 295 (хромосомный стандарт); *K. lactis* var. *lactis*: 1 – NRRL Y-1140; 2 – NRRL Y-1118; 3 – ВКМ 868; 4 – ВКМ Y-869; 5 – ВКМ Y-870; 6 – ВКМ Y-1186; 7 – ВКМ Y-1333; 8 – CBS 762; 9 – ВКМ Y-1339; 10 – ВКМ Y-1343; 11 – ВКМ Y-1868; 12 – ВКМ Y-762; 13 – ВКМ Y-896; 14 – ВКМ Y-1527; 15 – SM 3.8; 16 – SM 5.8; 17 – SM 6.7; 18 – SM 16.9; 19 – SM 48.7; 20 – UCM Y-328; 21 – CBS 845; 22 – CBS 1065; 23 – CBS 1067; 24 – CBS 1797; 25 – CBS 2360; 26 – CBS 2619; 27 – CBS 5618; 28 – CBS 8043; 29 – ВКПМ Y-492; 30 – ВКПМ Y-3737; 31 – Н1; 32 – Н2; 33 – Н3. Размеры хромосом (т.п.н.) приведены по кариотипическим стандартам *S. cerevisiae* YNN 235 и *W. canadensis* YB-4662-VIA. Хр. – хромосома.

Хромосомный полиморфизм генов LAC. С помощью Саузерн-гибридизации с зондом *LAC4* определена хромосомная локализация генов *LAC* (рис. 5). Локус *LAC1* выявлен у 7 штаммов, *LAC2* – у 19 штаммов и *LAC3* – у 4 штаммов (рис. 5). У штаммов UCM Y-328 и ВКПМ Y-492 (молочные продукты, Украина) обнаружены полимерные локусы *LAC1* и *LAC2* (рис. 5, дорожки 20 и 29). Штамм ВКМ Y-1868 (чал, Туркмения) имеет полимерные локусы *LAC1* и *LAC3* (рис. 5, дорожка 11). Не обнаружено корреляции между происхождением штаммов и наличием определённых локусов *LAC*. Большинство штаммов обладали локусом *LAC2*.

Сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей генов LAC4 и LAC12 дрожжей рода Kluyveromyces. Проведено секвенирование генов *LAC4* и *LAC12* различной хромосомной локализации у 11 штаммов *K. lactis* var. *lactis*, выделенных из молочных продуктов, почвы и в условиях госпиталя, а также у молочного штамма *K. marxianus* CBS 397. Полученные нуклеотидные последовательности сравнили между собой и с соответствующими последовательностями штаммов *K. lactis* var. *lactis* и остальных видов *Kluyveromyces*, депонированными в GenBank. Гены *LAC4* локусов *LAC1*, *LAC2* и *LAC3* различались 1–5 нуклеотидами. Выявлено большое сходство нуклеотидных последовательностей генов *LAC4* дрожжей var. *lactis* и штаммов *K. marxianus* молочного происхождения: всего 1–3 нуклеотидные замены. С другой стороны, последовательности генов *LAC4* молочных и природных штаммов *K. marxianus* различались более 60 нуклеотидными заменами. В целом, нуклеотидные последовательности генов β -галактозидаз дрожжей *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus* сходны на 89.94–99.97%, тогда как уровень их сходства с генами *LAC4* типовых культур *K. wickerhamii*, *K. aestuarii* и *K. nonfermentans* не превышает 70%.

Нуклеотидные последовательности гена пермеазы лактозы *LAC12* оказались более вариабельными. Различия между *LAC12*-последовательностями молочных штаммов *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus* составили 1–14 нуклеотидов. В генах *LAC12* природных штаммов *K. marxianus* обнаружено более 25 нуклеотидных замен. В целом, нуклеотидные последовательности генов *LAC12* дрожжей *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus* имеют 91.5–99% сходства, тогда как уровень их сходства с генами *LAC12* остальных видов *Kluyveromyces* не превышает 73%.

По полученным нуклеотидным последовательностям генов *LAC4* и *LAC12* были определены первичные структуры соответствующих белков (1025 и 587 аминокислотных остатков, соответственно). На основании анализа изученных аминокислотных последовательностей построено филогенетическое дерево (рис. 6). В сравнительный анализ были включены утилизирующие лактозу дрожжи *Scheffersomyces stipitis* и *Debaryomyces hansenii*. Относительно внешней группы, виды рода *Kluyveromyces* образовали отдельный кластер (бутстреп 100%), внутри которого выделяются два подкластера. Первый сформирован молочными штаммами *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus*: 99.10–99.79% сходства белков *LAC4* и *LAC12*. Второй образован белками *LAC4* и *LAC12* природных штаммов *K. marxianus* (95.81–100% сходства). Уровень сходства аминокислотных последовательностей β -галактозидаз и пермеаз природных изолятов *K. marxianus* и молочных дрожжей *K. lactis*/*K. marxianus* значительно ниже: 94.61–98.69%. Сходство β -галактозидаз и пермеаз дрожжей *K. lactis*/*K. marxianus* и остальных видов *Kluyveromyces* составляет 63.67–75.27%.

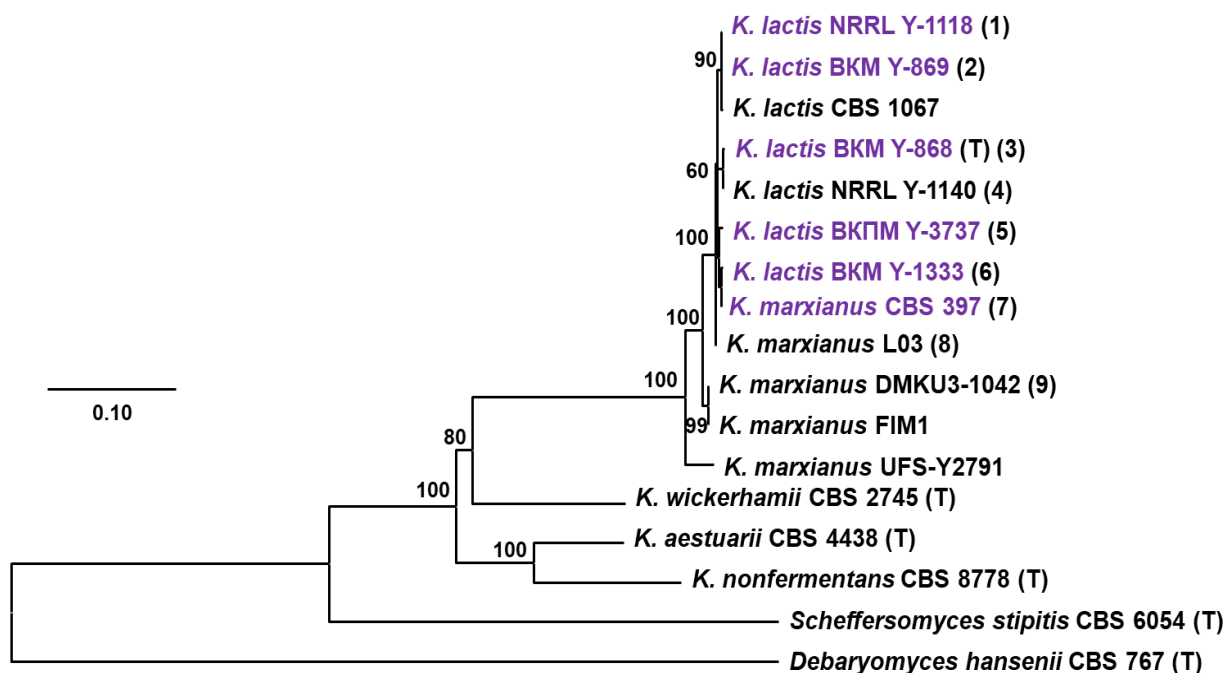


Рис. 6. Филогенетическое дерево сходства аминокислотных последовательностей β -галактозидаз и пермеаз лактозы дрожжей рода *Kluyveromyces*. В качестве внешней группы использовали пермеазы дрожжей *Scheffersomyces stipitidis* CBS 6054 и *Debaryomyces hansenii* CBS 767. Приведены значения бутстрепа >60%. Шкала соответствует 10 заменам на 100 аминокислотных позиций. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов с идентичными аминокислотными последовательностями: (1) – ВКМ Y-1527; (2) – ВКМ Y-870; (3) – CBS 845, GG799; (4) – CBS 1797; (5) – SM 48.7; (6) – ВКМ Y-1186, ВКМ Y-1339, ВКМ Y-1343; (7) – B0399, 100656-19; (8) – UFV-3, L03; (9) – DMB1, NBRC 1777, CBS 6556. Сиреневым цветом выделены последовательности, определённые в настоящей работе.

Таким образом, способность ферментировать лактозу у дрожжей *K. lactis* var. *lactis* контролируется тремя полимерными локусами *LAC* различной хромосомной локализации: *LAC1* (хромосома III), *LAC2* (хр. II) и *LAC3* (хр. IV). Большое сходство нуклеотидных и аминокислотных последовательностей генов *LAC4/LAC12* молочных штаммов *K. lactis* и *K. marxianus* указывает на общее происхождение их *LAC* локусов.

3. ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЛОКУСОВ *LAC* МОЛОЧНЫХ ДРОЖЖЕЙ *KLUYVEROMYCES LACTIS* VAR. *LACTIS*

Рекомбинационный анализ полимерных генов *LAC*. Ранее была проведена генетическая идентификация локусов *LAC1* (NRRL Y-1118) и *LAC2* (NRRL Y-1140) и установлено сцепление генов *LAC4* и *LAC12* в каждом из этих локусов (Наумов, 2008). С помощью тестов на аллелизм с локусами *LAC1* и *LAC2* мы провели генетическую идентификацию локуса *LAC3*.

Между штаммами *K. lactis* var. *lactis*, обладающими разными локусами *LAC* и маркированными ауксотрофными мутациями, были получены гибриды (табл. 2). Все гибриды имели регулярное мейотическое расщепление ауксотрофных маркеров. При скрещивании штаммов с разными локусами *LAC* (гибриды Н1–Н4) наблюдали дигенное расщепление по способности ферментировать лактозу. У гибрида Н5 (ВКМ Y-1333 \times ВКМ Y-1339) не наблюдали сегрегацию по признаку ферментации лактозы: все сегреганты имели локус *LAC3* и были способны сбраживать лактозу.

Таблица 2. Идентификация локуса *LAC3* у дрожжей *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* с использованием маркированных штаммов NRRL Y-1118 (*LAC1 lys*), NRRL Y-1140 (*LAC2 his*), ВКМ Y-1333 (*LAC3 met9*) и ВКМ Y-1339 (*LAC3 met5*)

Гибрид	Происхождение гибридов	Число тетрад с расщеплением $Lac^+ : Lac^-$			Генотип
		2:2	3:1	4:0	
H1	Y-1118×Y-1140	9	38	7	<i>MATα LAC1 lys/MATα LAC2 his</i>
H2	Y-1118×Y-1333	10	34	14	<i>MATα LAC1 lys/LAC3 met9</i>
H3	Y-1140×Y-1333	7	31	10	<i>MATα LAC2 his/LAC3 met9</i>
H4	Y-1118×Y-1339	2	25	6	<i>MATα LAC1 lys/MATα LAC3 met5</i>
H5	Y-1333×Y-1339	0	0	40	<i>LAC3 trp7/MATα LAC3 met5</i>

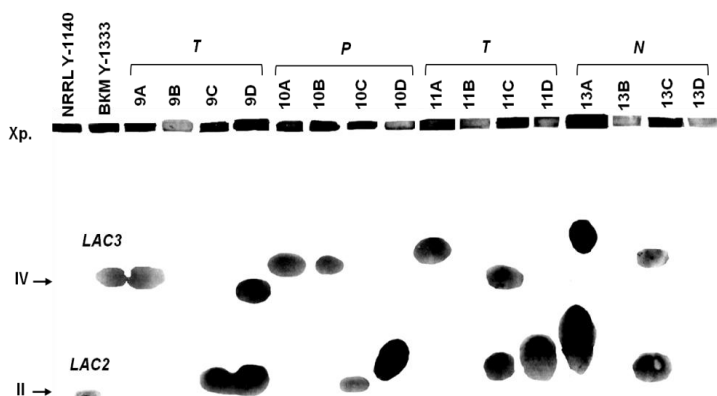


Рис. 7. Саузерн-гибридизация с зондом *LAC4* родительских штаммов NRRL Y-1140 (*LAC2*), ВКМ Y-1333 (*LAC3*) и сегрегантов гибрида. Типы тетрад: *T* – тетратип, *P* – родительский дитип, *N* – неродительский дитип. Хр. – хромосома.

Результаты Саузерн-гибридизации четырех полных тетрад гибрида NRRL Y-1140 (*LAC2*) × ВКМ Y-1333 (*LAC3*) с зондом *LAC4* полностью совпадают с результатами тетрадного анализа (рис. 7).

Таким образом, с помощью рекомбинационных тестов на аллелизм и Саузерн-гибридизации у дрожжей *K. lactis* var. *lactis* идентифицирован третий полимерный локус *LAC3*, расположенный на хромосоме IV.

Результаты эксперимента по межвидовой гибридизации *K. marxianus* и *K. lactis* популяция «krassilnikovii». По-видимому, дрожжи *K. lactis* var. *lactis* приобрели лактозные локусы *LAC* от молочных штаммов *K. marxianus*. В пользу этого свидетельствует общий источник выделения (молочные продукты) и общая система типов спаривания, позволяющая им скрещиваться и образовывать межвидовые гибриды (Наумов, 2005). Усваивающие лактозу штаммы *K. marxianus* встречаются в природных условиях, тогда как природные изоляты *K. lactis* не утилизируют лактозу и не имеют даже молчащей последовательности генов *LAC*. Результаты настоящего исследования свидетельствуют в пользу того, что в качестве первых реципиентов кластера генов *LAC4–LAC12* выступали обитающие в Европе и неспособные усваивать лактозу дрожжи популяции «krassilnikovii». Для проверки этого предположения нами были получены межвидовые гибриды между молочным штаммом *K. marxianus* CBS 397 (йогурт, Нидерланды) и не утилизирующим лактозу штаммом *K. lactis* CBS 9058 популяции «krassilnikovii» (сокотечение дуба, Воронеж). Гибриды получали массовым скрещиванием гаплоидных клеток на голодной среде с мальтозой. Оба штамма не растут на этой среде, так как штамм CBS 397 не способен ассимилировать мальтозу, а

штамм CBS 9058 ауксотрофен по урацилу. Полученные гибриды CBS 397 (Mal⁻/URA) × CBS 9058 (Mal⁺/ura) росли на минимальной среде с мальтозой. Были отобраны 9 гибридных сегрегантов, которые росли на мальтозе и активно сбраживали лактозу.

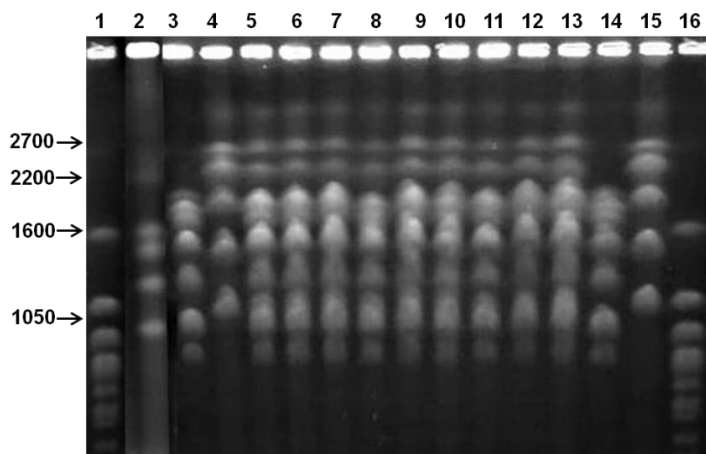


Рис. 8. Молекулярные кариотипы межвидовых гибридов *K. lactis* CBS 9058 популяции «krassilnikovii» × *K. marxianus* CBS 397. Хромосомные стандарты: 1, 16 – *S. cerevisiae* YNN 295; 2 – *W. canadensis* YB-4662-VIA; 3,14 – *K. marxianus* CBS 397; 4,15 – *K. lactis* популяции «krassilnikovii» CBS 9058; 5–13 – сегреганты гибрида CBS 9058 × CBS 397. Размеры приводятся по хромосомным стандартам.

Гибридные сегреганты были изучены с помощью молекулярного кариотипирования (рис. 8). Штамм *K. marxianus* CBS 397 имеет хромосомный профиль из восьми полос размерами около 950–1900 т.п.н., тогда как молекулярный кариотип штамма *K. lactis* CBS 9058 популяции «krassilnikovii» характеризуется пятью хромосомными полосами размерами от 1000 до 2600 т.п.н. (рис. 8, дорожки 3, 14 и 4, 15). В кариотипических профилях изученных сегрегантов объединены хромосомные полосы обоих родителей (рис. 8, дорожки 5–13).

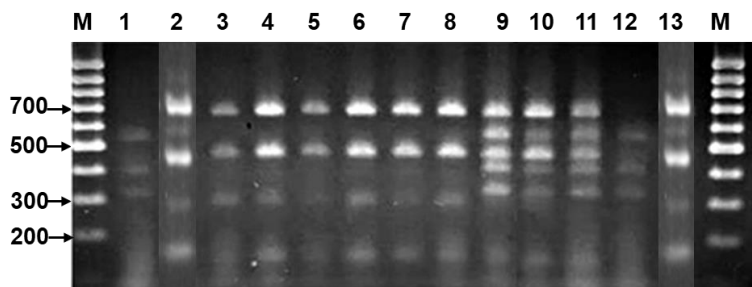


Рис. 9. Рестрикционный анализ амплифицированных фрагментов межгенного спейсера IGS2 рДНК сегрегантов гибрида *K. marxianus* CBS 397 × CBS 9058 *K. lactis* популяции «krassilnikovii» с помощью эндонуклеазы *AluI*. 1,12 – *K. marxianus* CBS 397; 2,13 –

«krassilnikovii»; 3–11 – сегреганты гибрида CBS 397 × CBS 9058. М – маркер молекулярных весов (п.н.) 100 bp DNA Ladder («Fermentans», Литва).

Родительские штаммы *K. marxianus* CBS 397 и *K. lactis* CBS 9058 популяции «krassilnikovii» можно также дифференцировать по ПДРФ-*AluI* профилям IGS2-района рДНК (рис. 9, дорожки 1,12 и 2, 13). По *AluI*-паттернам 9 изученных сегрегантов разделились на две группы. Шесть имели профиль штамма «krassilnikovii» CBS 9058 (рис. 9, дорожки 2,13 и 3–8). Три сегреганта имели гибридный *AluI*-профиль, в котором объединились фрагменты, характерные для *K. marxianus* и *K. lactis* популяции «krassilnikovii» (рис. 9, дорожки 9–11).

Таким образом, с помощью межвидовой гибридизации, гибридологического анализа, молекулярного кариотипирования и рестрикционного анализа подтверждена гипотеза о переносе лактозного кластера *LAC4–LAC12* из молочного штамма *K. marxianus* в геном природного Lac⁻ штамма *K. lactis* популяции «krassilnikovii».

4. МЕЖШТАММОВАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ ДРОЖЖЕЙ *KLUYVEROMYCES LACTIS* ДЛЯ СОЗДАНИЯ ШТАММОВ, СПОСОБНЫХ АКТИВНО СБРАЖИВАТЬ ЛАКТОЗУ

На основании физиологических тестов были отобраны 4 штамма, интенсивно сбраживающие лактозу: ВКМ Y-1339 (*LAC3*), ВКМ Y-1333 (*LAC3*), NRRL Y-1118 (*LAC1*) и NRRL Y-1140 (*LAC2*). Между ними были получены 11 гибридов, у которых определена интенсивность сбраживания 10%-ной лактозы. Гибриды NRRL Y-1118 × NRRL Y-1140 (Н1-2), NRRL Y-1118 × ВКМ Y-1333 (Н2-2), NRRL Y-1140 × ВКМ Y-1333 (Н3-1) и NRRL Y-1118 × ВКМ Y-1339 (Н4-1) были отобраны для изучения динамики утилизации лактозы и образования этилового спирта с помощью ВЭЖХ анализа. Для сравнения использовали активно сбраживающие лактозу штаммы *K. marxianus*: ВКМ Y-126, ВКМ Y-460, ВКМ Y-1335, ВКМ Y-1337 и CBS 397.

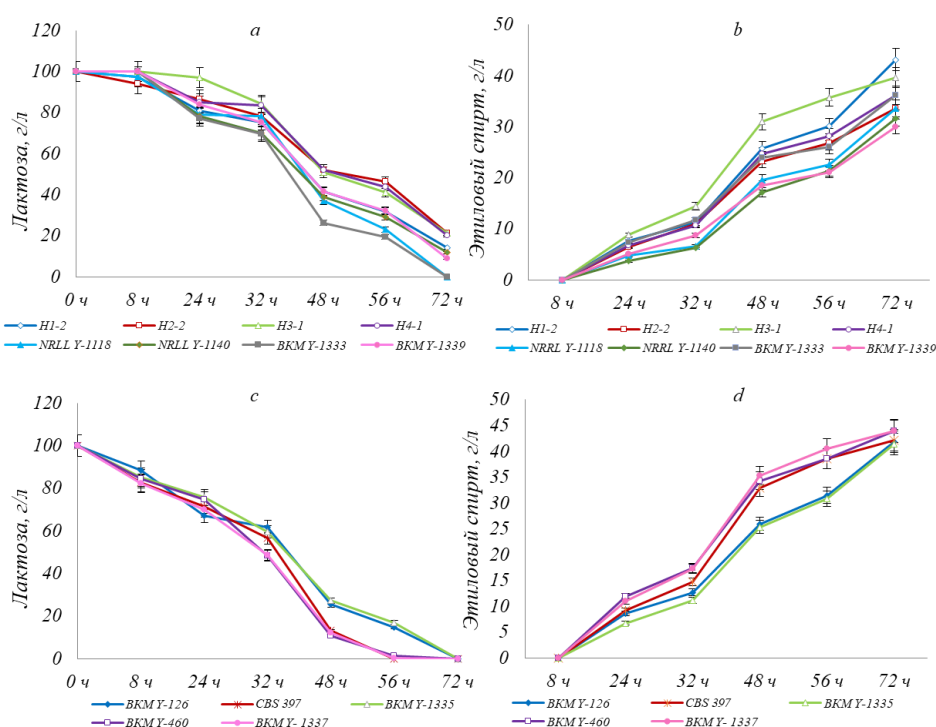


Рис. 10. ВЭЖХ анализ гидролиза 10%-ного раствора лактозы и образования этилового спирта штаммами *K. lactis* var. *lactis* и межштаммовыми гибридами (a, b) и дрожжами *K. marxianus* (c, d) через 8, 24, 32, 48, 56 и 72 ч.

Родительские штаммы быстрее утилизировали лактозу, чем гибриды (рис. 10a). По истечении 72 ч штаммы NRRL Y-1118 и ВКМ Y-1333 полностью гидролизировали лактозу. Среди гибридов лучшим был штамм Н1-2. Все гибриды, кроме Н2-2, образовывали больше спирта, чем родительские штаммы (рис. 10b). Штаммы *K. marxianus* ВКМ Y-460, ВКМ Y-1337 и CBS 397 полностью утилизировали лактозу уже через 56 ч, остальные – через 72 ч (рис. 10c). Штаммы *K. marxianus* также образовывали больше спирта (рис. 10d). Динамику сбраживания глюкозы и галактозы определяли у штаммов с лучшими показателями сбраживания лактозы и образования спирта (рис. 11). Через 72 часа полностью гидролизировали глюкозу штаммы *K. marxianus* ВКМ Y-1337, *K. lactis* var. *lactis* NRRL Y-1118 и гибриды Н1-2 и Н3-1 (рис. 11a). Наилучшая динамика гидролиза глюкозы отмечена у гибрида Н3-1. При сбраживании глюкозы наибольший выход спирта отмечен у гибридов Н1-2 (44,8 г/л) и Н3-1 (43,4 г/л), а также у штамма *K. marxianus* ВКМ Y-1337 (46 г/л) (рис. 11b). Несколько другая картина наблюдалась при сбраживании галактозы (рис. 11c и d). Изученные штаммы характеризовались достаточно низкой скоростью утилизации галактозы и спустя 72 часа ферментации гидролизировали не более 50% сахара в ферментационной среде. В

целом, изученные штаммы *K. marxianus* превосходили штаммы *K. lactis* по скорости гидролиза 10%-ных растворов лактозы, глюкозы и галактозы, а также по динамике накопления спирта. В то же время, два межштаммовых гибрида *K. lactis* – H1-2 (NRRL Y-1118 × NRRL Y-1140) и H3-1 (NRRL Y-1140 × ВКМ Y-1333) – практически не уступали дрожжам *K. marxianus* по большинству показателей, а по динамике сбраживания глюкозы превосходили их.

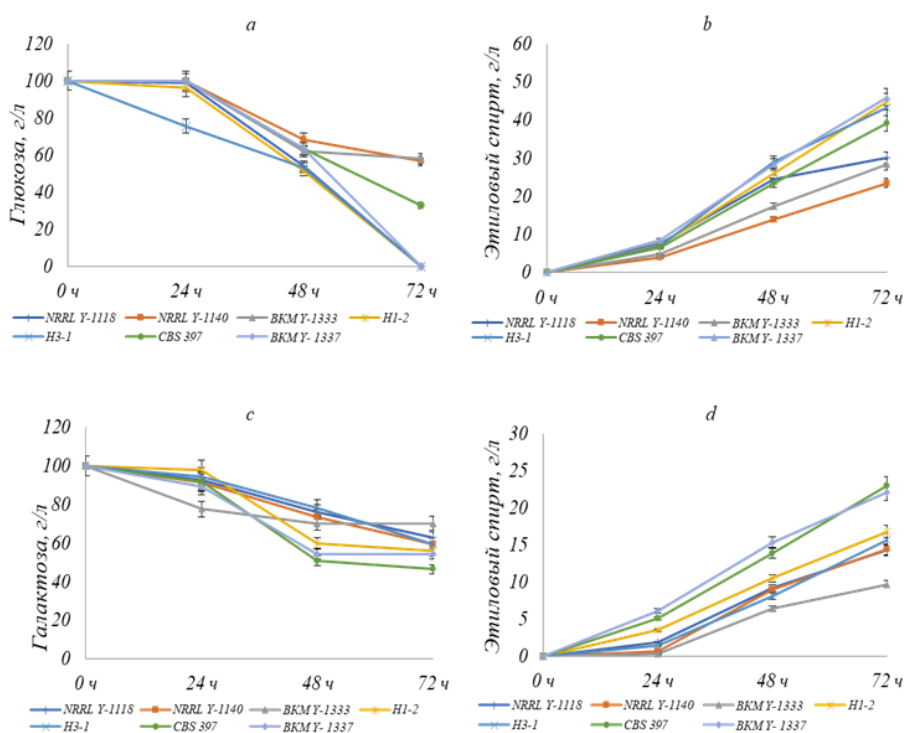


Рис. 11. ВЭЖХ анализ гидролиза 10%-ных растворов глюкозы и галактозы (a и c), а также образования этилового спирта (b, d) штаммами *K. lactis* var. *lactis*, межштаммовыми гибридами и дрожжами *K. marxianus* через 8, 24, 32, 48, 56 и 72 ч.

Таким образом, межштаммовая гибридизация молочных дрожжей *K. lactis* – эффективный метод создания штаммов, активно ферментирующих лактозу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые с помощью методов молекулярной и классической генетики проведено комплексное исследование дрожжей вида *K. lactis* на большом материале штаммов различного происхождения. Показано сложное строение комплексного вида *K. lactis* и подтверждена правомерность выделения сбраживающих лактозу штаммов в отдельную разновидность *K. lactis* var. *lactis*, штаммы которой имеют идентичные IGS2-*AluI* ПДРФ-паттерны, сходные нуклеотидные последовательности генов *EF-1α*, *ACT1* и ITS-участка, а также образуют фертильные гибриды с выживаемостью аскоспор 84–99%. К этой разновидности относятся молочные штаммы, клинические изоляты, почвенный штамм ВКПМ Y-3737, а также типовая культура таксономического вида *K. vanudenii* ВКМ Y-1535.

Полученные результаты указывают на несостоятельность отнесения природных *Lac⁻* штаммов к одной разновидности *K. lactis* var. *drosophilorum*, которая является гетерогенной и включает 6 генетически изолированных популяций: «*drosophilorum*», «*phaseolosporus*», «*krassilnikovii*», «*pseudovanudenii*», «водная» и «восточная». Указанные популяции характеризуются различными молекулярными кариотипами, уникальными заменами в гене *ACT1* и образуют полустерильные гибриды.

Заслуживает внимания биогеография дрожжей *K. lactis*. Сбраживающие лактозу штаммы *K. lactis* var. *lactis* выделяются в различных регионах мира; дрожжи «drosophilorum», «phaseolosporus», «pseudovanudenii» и «водная» характерны только для Северной Америки; «восточная» – для Дальневосточной Азии, а популяция «krassilnikovii» представлена европейскими и среднеазиатскими изолятами.

Генетические популяции в пределах вида *K. lactis* могут быть дифференцированы на основании нуклеотидных последовательностей гена *ACT1*. Принимая во внимание, что в GenBank имеется достаточно обширная база данных дрожжевых последовательностей гена *ACT1*, этот маркер может быть рекомендован для достоверной дифференциации внутривидовых популяций дрожжей вида *K. lactis*.

Результаты филогенетического анализа β-галактозидаз и пермеаз видов *Kluuyveromyces* указывают на общее происхождение локусов *LAC* дрожжей разновидности *K. lactis* var. *lactis* и молочных штаммов *K. marxianus* («fragilis»). В отличие от *K. marxianus*, природные штаммы *K. lactis* не способны утилизировать лактозу. Это указывает на то, что доместикация молочных дрожжей *K. lactis* var. *lactis* произошла на основе приобретения генного кластера *LAC4–LAC12* от молочных штаммов *K. marxianus*. На наш взгляд, наиболее вероятным реципиентом генного кластера *LAC4–LAC12* и прародителем культурных дрожжей *K. lactis* var. *lactis* являются европейские штаммы популяции «krassilnikovii», которые генетически не изолированы от молочных штаммов и не отличаются от них по молекулярным кариотипам. На основании полученных результатов и литературных данных предложена схема возможного приобретения не сбраживающими лактозу дрожжами популяции «krassilnikovii» генного кластера *LAC4–LAC12* (рис. 12).

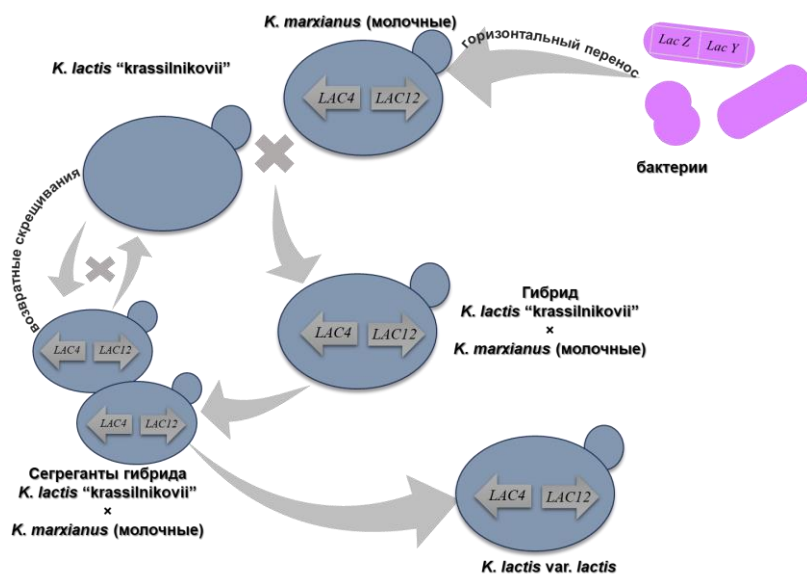


Рис. 12. Схема возможного приобретения генного кластера *LAC4–LAC12* природными дрожжами *K. lactis* популяции «krassilnikovii».

Интрогрессия кластера генов *LAC4–LAC12* в геном не сбраживающего лактозу штамма дрожжей *K. lactis* популяции «krassilnikovii» могла произойти в процессе межвидовой гибридизации с молочными дрожжами *K. marxianus*, например, в процессе производства кисломолочных продуктов в Европе. Характерные для производства сыра липиды недавно обнаружены в Юго-Восточной Европе в черепках керамики возрастом от 7400 до 6800 лет (McClure et al., 2018), что по времени совпадает с одомашниванием молочных видов животных (Larson, Fuller, 2014). Затем под

воздействием селекционного отбора происходили многократные возвратные скрещивания межвидовых Lac⁺ сегрегантов с родительским Lac⁻ штаммом популяции «krassilnikovii» (рис. 12). В результате серии возвратных скрещиваний и мейотической рекомбинации мог сформироваться современный геном молочных дрожжей *K. lactis* var. *lactis*. Скорее всего, перенос лактозного кластера генов дрожжей *K. marxianus* был осуществлен на правое плечо хромосомы II дрожжей *K. lactis*. На это указывает тот факт, что большинство изученных нами штаммов *K. lactis* var. *lactis* обладали локусом *LAC2*. Этим локусом обладали молочные, госпитальные, а также природные почвенные штаммы. Локусы *LAC1* и *LAC3* могли произойти от локуса *LAC2* в процессе внутривидовой гибридизации за счет рекомбинации гомологичных субтеломерных последовательностей различных хромосом. Дрожжи *K. marxianus* могли приобрести лактозные гены в результате горизонтального переноса соответствующих генов от молочнокислых бактерий (Poch et al., 1992).

ВЫВОДЫ

1. С помощью филогенетического анализа, молекулярного кариотипирования и гибридологического анализа показано сложное строение комплексного вида *K. lactis* и подтверждена правильность выделения сбразивающих лактозу штаммов в отдельную разновидность *K. lactis* var. *lactis*. Установлено, что физиологическая разновидность *K. lactis* var. *drosophilorum* гетерогенна и представлена шестью генетически изолированными популяциями («*drosophilorum*», «*phaseolosporus*», «*krassilnikovii*», «*pseudovanudenii*», «водная» и «восточная») в статусе таксономических разновидностей.

2. Показано, что на основании нуклеотидных последовательностей гена *ACT1* можно достоверно дифференцировать разновидность дрожжей *K. lactis* var. *lactis* и шесть природных генетических популяций в пределах вида *K. lactis*.

3. Установлено, что у дрожжей *K. lactis* var. *lactis* способность ферментировать лактозу контролируется тремя полимерными локусами *LAC* различной хромосомной локализации: *LAC1* (хромосома III), *LAC2* (хромосома II) и *LAC3* (хромосома IV). С помощью филогенетического и рекомбинационного анализов установлено сложное строение локуса *LAC3*, включающего кластер генов *LAC4–LAC12* (гены β-галактозидазы и пермеазы лактозы).

4. Филогенетический анализ выявил значительные различия между белками *LAC4* и *LAC12* дрожжей рода *Kluyveromyces*: *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. aestuarii*, *K. nonfermentans*, *K. wickerhamii*. Обнаружена корреляция между последовательностями β-галактозидаз/пермеаз и экологическим происхождением штаммов *Kluyveromyces*: молочные продукты и природные источники.

5. С помощью межвидовой гибридизации, гибридологического анализа, молекулярного кариотипирования и ПДРФ-анализа продемонстрирован возможный путь переноса лактозного кластера *LAC4–LAC12* из молочного штамма *K. marxianus* в геном природного Lac⁻ штамма *K. lactis* популяции «*krassilnikovii*».

6. Показано, что межштаммовая гибридизация является перспективным методом создания молочных штаммов *Kluyveromyces*, способных активно ферментировать лактозу.

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Научные статьи, опубликованные в журналах, индексируемых в базах данных Scopus, WoS, RSCI

1. Лютова Л.В., Наумов Г.И., Шнырева А.В., Наумова Е.С. Молекулярный полиморфизм генов β -галактозидазы *LAC4* у молочных и природных штаммов дрожжей *Kluyveromyces* // Молекулярная биология. 2021. Т. 55. № 1. С. 75–85. ИФ (РИНЦ) = 0.72 (Lyutova L.V., Naumov G.I., Shnyreva A.V., Naumova E.S. Molecular polymorphism of β -galactosidase *LAC4* genes in dairy and natural strains of *Kluyveromyces* yeasts // Molecular Biology. 2021. V. 55. № 1. P. 66–74. IF (WoS) = 1.2) Вклад автора в печатных листах: (0.687 п.л./0.5 п.л.)
2. Лютова Л.В., Наумова Е.С. Межштаммовая гибридизация дрожжей *Kluyveromyces lactis* для создания штаммов, активно сбраживающих лактозу // Биотехнология. 2021. Т. 37. № 4. С. 41–48. ИФ (РИНЦ) = 0.39 (Lyutova L.V., Naumova E.S. Inter-strain hybridization of *Kluyveromyces lactis* yeast for creating efficient lactose-fermenting strains // Applied Biochemistry and Microbiology. 2022. V. 58. P. 909–915. IF (WoS) = 0.8) (0.5 п.л./0.375 п.л.)
3. Лютова Л.В., Наумов Г.И., Шнырёва А.В., Наумова Е.С. Внутривидовой полиморфизм дрожжей *Kluyveromyces lactis*: генетические популяции // Микробиология. 2022. Т. 91. № 4. С. 480–491. ИФ (РИНЦ) = 1.052 (Lyutova L.V., Naumov G.I., Shnyreva A.V., Naumova E.S. Intraspecific polymorphism of the yeast *Kluyveromyces lactis*: genetic populations // Microbiology. 2022. V. 91. № 4. 421–431. IF (WoS) = 1.5) (0.75 п.л./0.562 п.л.)
4. Лютова Л.В., Наумова Е.С. Сравнительный анализ сбраживания лактозы и её компонентов, глюкозы и галактозы, межштаммовыми гибридами молочных дрожжей *Kluyveromyces lactis* // Биотехнология. 2023. Т. 39. № 1. С. 3–11. ИФ (РИНЦ) = 0.39 (Lyutova L.V., Naumova E.S. Comparative analysis of fermentation of lactose and its components, glucose and galactose, by interstrain hybrids of dairy yeast *Kluyveromyces lactis* // Applied Biochemistry and Microbiology. 2023. V. 59. № 9. P. 1150–1156. IF (WoS) = 0.8) (0.562 п.л./0.437 п.л.)