

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Боровкова Алена Николаевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ КУЛЬТУРНЫХ
И ПРИРОДНЫХ ДРОЖЖЕЙ РОДА *SACCHAROMYCES***

Специальности 1.5.18. – Микология,
1.5.7. – Генетика

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
д.б.н., профессор
Наумова Елена Сергеевна

Научный руководитель
д.б.н., доцент
Шнырева Алла Викторовна

МОСКВА – 2024

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
ГЛАВА 1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ВИДЫ ДРОЖЖЕЙ РОДА SACCHAROMYCES	15
1.1. Традиционная систематика дрожжей <i>Saccharomyces</i>	15
1.2. ДНК-ДНК реассоциация и гибридологический анализ	17
1.2.1. Вид <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
1.2.2. Вид <i>Saccharomyces bayanus</i>	20
1.2.3. Вид <i>Saccharomyces paradoxus</i>	21
1.2.4. Виды <i>Saccharomyces cariocanus</i> , <i>S. kudriavzevii</i> и <i>S. mikatae</i>	23
1.3. Филогенетический анализ	24
1.4. Молекулярная дифференциация дрожжей видов рода <i>Saccharomyces</i>	26
1.4.1. ПДРФ-анализ 5.8S- ITS-фрагмента и межгенного спейсера IGS2	26
1.4.2. Молекулярное карiotипирование и Саузерн-гибридизация	27
1.4.3. Видоспецифичные праймеры	28
1.5. Дивергенция геномов видов рода <i>Saccharomyces</i>	29
1.5.1. Сравнительный анализ геномов.....	29
1.5.1.1. Вид <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
1.5.1.2. Вид <i>Saccharomyces paradoxus</i>	35
1.5.1.3. Комплексный вид <i>Saccharomyces bayanus</i>	37
1.5.1.4. Виды <i>Saccharomyces cariocanus</i> , <i>S. mikatae</i> , <i>S. kudriavzevii</i> , <i>S. arboricola</i> и <i>S. jurei</i>	42
1.5.2. Хромосомные перестройки: реципрокные транслокации	45
1.5.3. Межвидовые гибриды <i>Saccharomyces</i>	48
ГЛАВА 2. СУБТЕЛОМЕРНЫЕ ГЕНЫ ФЕРМЕНТАЦИИ САХАРОВ	51
2.1. Теломеры дрожжей <i>Saccharomyces</i>	51
2.2. α-Глюкозидазы: мальтазы и изомальтазы	52

2.3. α -Галактозидазные гены ферментации мелибиозы	55
2.4. β -Фруктозидазные гены <i>SUC</i> , контролирующие ферментацию сахарозы.....	56
ГЛАВА 3. СУБТЕЛОМЕРНЫЕ ПЕКТИНАЗНЫЕ ГЕНЫ <i>PGU</i>, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ПЕКТИНА	59
3.1. Пектиновые вещества растений.....	59
3.2. Общая характеристика пектиназ	61
3.3. Эндо-полигалактуроназы дрожжей видов <i>Saccharomyces</i>	62
3.3.1. Вид <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	62
3.3.2. Вид <i>Saccharomyces bayanus</i>	64
3.3.3. Вид <i>Saccharomyces paradoxus</i>	65
 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
ГЛАВА 4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	66
4.1. Объекты исследования.....	66
4.2. Микробиологические методы.....	66
4.2.1. Среды для культивирования и споруляции	66
4.2.2. Определение пектинолитической активности	67
4.3. Молекулярные методы.....	67
4.3.1. ПЦР-анализ	67
4.3.2. ПДРФ-анализ ПЦР-амплифицированных IGS2- и 5.8-ITS-участков рДНК.....	70
4.3.3. Секвенирование и филогенетический анализ	71
4.3.4. Пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК и Саузерн-гибридизация	72
4.4. Гибридологический анализ.....	74
4.4.1. Получение ауксотрофных мутантов	74
4.4.2. Получение и анализ гибридов	75
 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	
ГЛАВА 5. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ ДРОЖЖЕЙ <i>SACCHAROMYCES</i>: БИОЛОГИЧЕСКИЙ ВИД <i>S. JUREI</i>	77

5.1. Определение видовой принадлежности новых штаммов	77
5.2. Мультигенный филогенетический анализ	81
5.3. Молекулярное карiotипирование и Саузерн-гибридизация	86
5.4. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей β -фруктозидаз.....	90
5.5. Обсуждение.....	91
ГЛАВА 6. ВНУТРИВИДОВОЙ ПОЛИМОРФИЗМ БИОЛОГИЧЕСКОГО ВИДА <i>SACCHAROMYCES BAYANUS</i>	93
6.1. ПДРФ-анализ амплифицированных IGS2-фрагментов рДНК....	93
6.2. Мультигенный филогенетический анализ.....	95
6.3. Молекулярное карiotипирование и Саузерн-гибридизация.....	101
6.4. Сравнительный анализ α -галактозидазных генов <i>MEL</i> ферментации мелибиозы.....	105
6.5. Гибридологический анализ.....	110
6.6. Обсуждение.....	115
ГЛАВА 7. α-ГЛЮКОЗИДАЗЫ <i>MAL</i> И <i>IMA</i> ДРОЖЖЕЙ <i>SACCHAROMYCES</i>.....	116
7.1. Филогенетическое происхождение α -глюкозидаз <i>MAL</i> и <i>IMA</i> генетической линии <i>S. cerevisiae</i> S288C.....	116
7.2. α -Глюкозидазы <i>MAL</i> и <i>IMA</i> видов рода <i>Saccharomyces</i>	120
7.3. Обсуждение.....	122
ГЛАВА 8. ПРИРОДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ПЕКТИНАЗНЫХ ГЕНОВ <i>PGU</i> ДРОЖЖЕЙ <i>SACCHAROMYCES</i>.....	124
8.1. Вид <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	125
8.2. Вид <i>Saccharomyces bayanus</i>	126
8.3. Вид <i>Saccharomyces paradoxus</i>	127
8.4. Виды <i>Saccharomyces arboricola</i> , <i>S. cariocanus</i> , <i>S. jurei</i> , <i>S. kudriavzevii</i> и <i>S. mikatae</i>	129
8.5. Хромосомная локализация генов <i>PGU</i> у дрожжей <i>Saccharomyces</i>	130
8.6. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей эндо-полигалактуроназ дрожжей комплекса <i>S. bayanus</i>	136

8.7. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей эндо-полигалактуроназ дрожжей <i>Saccharomyces</i>	140
8.8. Обсуждение.....	142
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	145
ВЫВОДЫ.....	154
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	156
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	187

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

На протяжении многих веков человечество использует дрожжи *Saccharomyces* для хлебопечения, пивоварения, виноделия и производства спирта. Культурный генофонд дрожжей *Saccharomyces* представлен видами *S. cerevisiae* и *S. bayanus*, используемыми в промышленных ферментациях. Остальные шесть видов – *S. arboricola*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii* и *S. jurei* – не связаны с хозяйственной деятельностью человека и встречаются преимущественно в природе (Kuztman et al., 2011; Naseeb et al., 2017). Однако, такое деление на культурные и природные дрожжи достаточно условно. В последние годы показана перспективность применения в пивоварении дрожжей видов *S. arboricola*, *S. jurei* и *S. mikatae* или их гибридов с традиционным видом *S. cerevisiae* (Nikulín et al., 2018; Hutzler et al., 2021). Естественные межвидовые гибриды *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii* и *S. cerevisiae* × *S. bayanus* × *S. kudriavzevii* обнаружены среди коммерческих винных, пекарских и пивных дрожжей (Peris et al., 2018; Morard et al., 2020; Vendixsen et al., 2022). В этой связи перспективным является поиск штаммов-сахаромицетов, обладающих важными для различных ферментационных процессов характеристиками.

Для винных дрожжей важным свойством является способность расщеплять содержащиеся в ягодах винограда пектиновые вещества, высокое содержание которых затрудняет процесс отделения и осветления виноградного сусла, а также приводит к появлению коллоидных помутнений и засорению фильтров (Van Rensburg, Pretorius, 2000). Пектин – это полисахарид растительного происхождения, состоящий из соединенных между собой $\alpha(1-4)$ -гликозидной связью остатков частично метилированной галактуроновой кислоты. Расщепление высокомолекулярных пектиновых веществ растительного происхождения – сложный процесс с участием нескольких ферментов, основным из которых является пектиназа (эндо-

полигалактуроназа, К.Ф. 3.2.1.15). Традиционные для виноделия дрожжи *S. cerevisiae*, как правило, не обладают пектинолитической активностью (Divol, Rensburg, 2007; Fernández-González et al., 2004; Louw et al., 2010). Высокая пектинолитическая активность была обнаружена у французского шампанского штамма *S. bayanus* (Gainvors et al., 1994; Gognies et al., 1999; Naumov et al., 2001a). На ограниченном количестве штаммов было показано, что дрожжи *S. bayanus* обладают тремя полимерными генами *PGU1b*, *PGU2b* и *PGU3b* (Наумов и др., 2016а, б; Наумова и др., 2019). Практически ничего не известно о пектинолитической активности остальных видов *Saccharomyces*, а их пектиназные гены ранее не изучались.

Большое значение для виноделия имеют также холодоустойчивые дрожжи вида *S. bayanus*. Растущий интерес к изучению этих дрожжей связан с их возможной ролью в качестве одного из донорских родительских геномов пивных дрожжей низового брожения *S. pastorianus*. Дрожжи комплексного вида *S. bayanus* представлены двумя разновидностями: *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. bayanus* var. *ivarum* (Наумов, 2000; Vaughan-Martini, Martini, 2011).

Некоторые авторы возводят указанные разновидности в ранг отдельных видов: *S. bayanus* и *S. ivarum* (Pulvirenti et al., 2000; Nguyen, Gaillardin, 2005; Rainieri et al., 2006). Другие авторы предлагают упразднить вид *S. bayanus* как “неправильный”, содержащий чужеродные субтеломерные последовательности вида *S. cerevisiae*, и восстановить таксономически “чистый” вид *S. ivarum* (Rainieri et al., 1999; Nguyen et al., 2000; Nguyen, Gaillardin, 2005). Родственные дрожжи вида *S. eubayanus* были сначала описаны на изолятах из Аргентины, а позднее обнаружены в Китае, США, Канаде, Австралии, Новой Зеландии и недавно в Европе (Ирландия) (Libkind et al., 2011; Bing et al., 2014; Peris et al., 2016; Gayevskiy et al., 2016; Nespolo et al., 2020; Bergin et al., 2022). Полногеномное секвенирование нескольких штаммов вида *S. eubayanus* выявило их большое сходство с холодоустойчивым родителем европейских пивных дрожжей *S. pastorianus*

(Baker et al., 2015; Hebly et al., 2015; Sampaio, 2018; Bergin et al., 2022). Еще больше усложнило понимание таксономического статуса дрожжей *S. bayanus* обнаружение в Новой Зеландии и Западном Китае штаммов, которые по ряду молекулярных маркеров значительно отличаются от *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *ivarum* и *S. eubayanus* (Almeida et al., 2014; Bing et al., 2014).

Сравнительный анализ полноразмерных геномов биологических видов *Saccharomyces* показал, что наиболее изменчивыми участками в геномах дрожжей являются субтеломерные районы хромосом, в которых расположены полимерные гены ферментации различных сахаров (мальтозы, изомальтозы, мелибиозы, сахарозы и др.); а теломерные участки хромосом являются наиболее пластичной областью генома, обеспечивающей приспособляемость дрожжей к различным условиям окружающей среды (Cliften et al., 2001; Kellis et al., 2003; Liti et al. 2013; Naseeb et al., 2018). Способность ферментировать мальтозу и изомальтозу очень важна для пекарских, пивных и спиртовых дрожжей *S. cerevisiae*. В геноме генетической линии дрожжей *S. cerevisiae* S288C имеются два α -глюкозидазных гена *MAL* (*MAL12* и *MAL32*), контролирующих ферментацию мальтозы, и пять генов изомальтаз *IMA1–IMA5*, отвечающих за ферментацию α -метилглюкозида и изомальтозы (Наумов, Наумов, 2010; Brown et al., 2010; Teste et al., 2010). Следует отметить, что имеющиеся в литературе данные об эволюции α -глюкозидаз, депонированных в международных генетических базах, неполные, и происхождение α -глюкозидаз *IMA* и *MAL* дрожжей *Saccharomyces* остается неясным.

Целью данной работы является изучение природного разнообразия и эволюции дрожжей рода *Saccharomyces* на материале штаммов различного экологического и географического происхождения.

В этой связи в работе решались следующие **задачи**:

1. Сравнение геномов восьми видов рода *Saccharomyces* с помощью молекулярного кариотипирования и мультигенного филогенетического анализа.

2. Изучение дивергентных популяций дрожжей комплексного вида *S. bayanus* с помощью гибридологического анализа и молекулярных маркеров с целью установления их таксономического статуса.

3. Установление филогенетического происхождения α -глюкозидаз IMA и MAL дрожжей рода *Saccharomyces*.

4. Скрининг штаммов *Saccharomyces* различного экологического и географического происхождения, способных секретировать активную эндополигалактуроназу, и отбор штаммов с высокой пектинолитической активностью.

5. Идентификация субтеломерных генов *PGU*, контролирующих расщепление пектина у дрожжей *Saccharomyces*, и определение их хромосомной локализации.

6. Определение нуклеотидной последовательности генов *PGU* дрожжей рода *Saccharomyces* и филогенетический анализ пектиназ.

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

Научная новизна и практическая значимость. Впервые в России обнаружен редкий вид дрожжей *S. jurei* и разработан экспресс-метод его молекулярной дифференциации. В молекулярном кариотипе *S. jurei* выявлены две реципрокные транслокации: одна уникальная (между хромосомами I и XIII), а вторая общая с дрожжами вида *S. mikatae* (хромосомы VI/VII). Установлено, что только хромосома III, в которой расположен локус типа спаривания MAT, имеет примерно одинаковые размеры у всех видов рода *Saccharomyces*. Мультигенный филогенетический анализ показал, что вид *S. jurei* филогенетически наиболее близок виду *S. mikatae*, а *S. bayanus* и *S. arboricola* – наиболее дивергентные виды рода *Saccharomyces*.

С помощью методов молекулярной и классической генетики в комплексном виде *S. bayanus* обнаружены дивергентные популяции в Новой

Зеландии и Западном Китае, которые отличаются по молекулярным маркерам и образуют полустерильные гибриды с остальными популяциями. Между *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *ivarum*, *S. eubayanus*, новозеландской и западнокитайской популяциями нет полной постзиготической изоляции, и все они относятся к одному биологическому виду, обладая дивергенцией геномов на уровне таксономических разновидностей.

Установлено, что изомальтазы (ИМА) и мальтазы (МАЛ) имелись в геноме у общего протоплоидного предка дрожжей родов *Saccharomyces*, *Lachancea* и *Kluyveromyces*, т.е. возникли еще до эволюционного расхождения этих родов и прежде, чем произошла полная дупликация генома *Saccharomyces*. Затем в каждом роде и виде происходила дивергенция собственных последовательностей α -глюкозидаз, имеющих как ИМА, так и МАЛ активности. Дивергентная изомальтаза ИМА5 появилась в геноме видов рода *Saccharomyces* уже после их расхождения с протоплоидными дрожжами двух других родов – *Lachancea* и *Kluyveromyces*.

Впервые проведен масштабный скрининг пектинолитической активности у дрожжей *Saccharomyces* и обнаружен значительный внутри- и межвидовой полиморфизм этого признака. Показано, что наибольшая пектинолитическая активность характерна для видов *S. bayanus* и *S. paradoxus*. Установлено, что виды *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* и *S. paradoxus* обладают только одним геном *PGU*, расположенным в хромосоме X. У остальных видов обнаружены полимерные гены *PGU* разной хромосомной локализации: у *S. mikatae* и *S. jurei* – на хромосомах X и VIII, у *S. bayanus* – на хромосомах X, I и XIV.

Впервые проведен сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей генов *PGU* у всех видов рода *Saccharomyces*. Обнаружена видоспецифичность генов *PGU*, а также их внутривидовой полиморфизм у дрожжей *S. kudriavzevii*, который связан с географическим происхождением штаммов. Обнаружены штаммы *S.*

cerevisiae, *S. bayanus* и *S. paradoxus*, секретирующие активную эндополигалактуроназу и представляющие интерес для дальнейших исследований и селекционных работ с винными дрожжами.

Методология и методы исследования. Изученные в работе штаммы получены из коллекции лаборатории молекулярной генетики дрожжей КК НБИКС-ПТ центра геномных исследований «Курчатовский геномный центр», на базе которого проводилось исследование. Несколько штаммов получены из российских коллекций ВКПМ (Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, Москва, Россия) и ВКМ (Всероссийская Коллекция Микроорганизмов, Пущино, Россия), а также из американской коллекции UCDFST (Phaff Yeast Culture Collection, Department of Food Science and Technology, University of California, Дэвис, США). Методическая основа данного исследования включает в себя микробиологические, молекулярные (полимеразная цепная реакция (ПЦР), анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ), секвенирование ядерных и митохондриальных генов, молекулярное кариотипирование и Саузерн-гибридизация), генетические (гибридологический анализ) методы, а также филогенетические подходы определения родства между организмами. Для обработки полученных результатов использовали пакеты компьютерных программ (IC Measure_2.0.0.272; BioEdit; MEGA 10), а также базы данных GenBank. Тетрадный анализ потомства аскоспор в скрещиваниях проводили с использованием микроманипулятора Carl Zeiss Jena.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Редкий вид *S. jurei* филогенетически наиболее близок виду *S. mikatae*. В кариотипе *S. jurei* имеется две реципрокные транслокации – одна уникальная (хромосомы I/XIII), а вторая общая с видом *S. mikatae*: VI/VII. Только хромосома III имеет примерно одинаковые размеры у всех видов рода *Saccharomyces*.

2. Комплексный вид *S. bayanus* включает пять генетических популяций (*S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *ivarum*, *S. eubayanus*, новозеландская и западнокитайская), которые относятся к одному биологическому виду *S. bayanus*, обладая дивергенцией геномов на уровне таксономических разновидностей.

3. Гены изомальтаз IMA и мальтаз MAL имелись в геноме общего протоплоидного предка дрожжей родов *Saccharomyces*, *Lachancea* и *Kluveromyces*, т.е. возникли еще до эволюционного расхождения этих родов и прежде, чем произошла полная дупликация генома *Saccharomyces*. Дивергентная изомальтаза IMA5 появилась в геноме дрожжей рода *Saccharomyces* уже после их расхождения с дрожжами *Lachancea* и *Kluveromyces*.

4. Способность секретировать активную эндо-полигалактуроназу является видовой особенностью дрожжей *S. bayanus* и *S. paradoxus*. Виды *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* и *S. paradoxus* обладают только одним геном *PGU*, расположенным в хромосоме X. У остальных трех видов имеются полимерные копии генов *PGU* разной хромосомной локализации: у видов *S. mikatae* и *S. jurei* на хромосомах X и VIII, у вида *S. bayanus* на хромосомах X, I и XIV. Обнаружен внутривидовой полиморфизм генов *PGU* у дрожжей *S. kudriavzevii*, который определяется географическим происхождением штаммов.

Личный вклад автора. Личный вклад автора в работу состоял в проведении всех экспериментов. Освоены микробиологические методы культивирования штаммов, различные молекулярные методы и гибридологический анализ. Полученные результаты обработаны с использованием математических методов статистики и современных компьютерных программ; результаты представлены в научных публикациях.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов обоснована применением современных методов с использованием

качественных реактивов. Работа выполнялась на современном оборудовании ведущих мировых производителей. Эксперименты проведены в повторностях и хорошо воспроизводимы.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на Всероссийской конференции «1-й Российский микробиологический конгресс» (2017, Пущино); Международной конференции «XXXVII Annual Meeting of the European Culture Collections' Organisations ECCO 2018» (2018, Москва); Всероссийской школе-конференции «Генетика микроорганизмов: от геномики к биоэкономике» (2018, Пущино); 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 (VSGB) and Associate Symposiums» (2019, Санкт-Петербург); Международной конференции «ISSY 35 The 35th International Specialized Symposium on Yeasts» (2019, Анталья, Турция); Всероссийской конференции «3-й Российский микробиологический конгресс» (2021, Псков).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 6 статей в рецензируемых журналах, которые индексируются в международных базах данных Scopus и Web of Science.

Объём и структура диссертационной работы. Материалы диссертации изложены на 214 страницах машинописного текста, содержат 36 рисунков и 4 таблицы. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, экспериментальная часть, результаты и обсуждения (в четырёх главах), заключение, выводы, список литературы и приложение. Список литературы включает 282 источника.

Благодарности. Выражаю особую благодарность своим научным руководителям – д.б.н., профессору Е.С. Наумовой и д.б.н., профессору А.В. Шныревой за помощь и советы в ходе выполнения работы, за предоставление литературных данных и необходимого оборудования. Благодарю к.б.н. В.И.

Кондратьеву за обучение методике классического генетического анализа, готовность и желание делиться опытом и знаниями. Благодарю к.б.н. Д.Г. Наумова и к.т.н. М.Ю. Шаламитского за помощь в освоении методик и подготовке некоторых экспериментов. Также выражаю искреннюю благодарность коллективу кафедры микологии и альгологии биологического факультета за внимание к работе, своевременные и ценные замечания. Сердечно благодарю своих родных и близких, и всех, кто прямо или косвенно помогал при написании этой работы и вдохновлял своим опытом!

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-00309).

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛАВА 1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ВИДЫ ДРОЖЖЕЙ РОДА *SACCHAROMYCES*

1.1. Традиционная систематика дрожжей *Saccharomyces*

Первоначально систематика дрожжей строилась исключительно на морфологических, физиологических и биохимических признаках. Описанный в 1838 году род *Saccharomyces* включал в себя три вида: *S. cerevisiae* – пивные штаммы, *S. vini* – винные изоляты и *S. pomorum* – штаммы, выделенные из сидра (Meyen, 1838). Hansen ввел технику чистых культур и дал пивным дрожжам верхового брожения название *S. cerevisiae*, а низового – *S. carlsbergensis* (Naumov, 1996). В дальнейшем видовой состав рода *Saccharomyces* существенно изменялся. Штаммы, различающиеся по способности сбраживать и ассимилировать различные сахара, были описаны как отдельные таксономические виды. История многочисленных ревизий рода *Saccharomyces* подробно описана в обзоре J. Barnett (1992). В начале 20-го века была создана первая грибная коллекция CBS в Голландии (1904) и был издан первый определитель дрожжей, включающий 46 видов *Saccharomyces* (Guilliermond, 1914). Позднее, Stelling-Dekker (1931) и Lodder (1932) сократили число видов рода *Saccharomyces* до 42, перенесли некоторые из них в другие роды.

Первый отечественный определитель дрожжей был создан в 1954 году В.И. Кудрявцевым. Род *Saccharomyces* был в нём представлен 18 видами, различающимися ферментационными спектрами: *S. globosus* Osterwalder, *S. ribis* Ludwig, *S. paradoxus* Batshinskaja, *S. casei* Harrison, *S. lactis* Adametz, *S. cartilaginosus* Lindner, *S. vini* Meyen, *S. cerevisiae* Meyen, *S. coreanus* Saito, *S. uvarum* Beijerick, *S. carlsbergensis* Hansen, *S. chevalieri* Guillermond, *S. oviformis* Osterwalder, *S. bayanus* Saccardo, *S. chodati* Steiner, *S. heterogenicus* Osterwalder, *S. acerios-sacchari* Fabian et Hall, *S. prostoserdovi* sp. nov.

Kudriavzev (Кудрявцев, 1954). Для дрожжей *S. lactis* Adametz было характерно наличие фермента сбраживающего лактозу, а для дрожжей *S. cartilaginosus* Lindner – мальтозу.

Позднее, на основании различий по морфологическим и физиологическим признакам род *Saccharomyces* был разделён на две группы: *Saccharomyces sensu stricto* и *Saccharomyces sensu lato* (van der Walt, 1970). К дрожжам *Saccharomyces sensu stricto* были отнесены виды, которые характеризовались активным сбраживанием сахаров. К дрожжам *sensu lato* были отнесены виды не близкородственные *S. cerevisiae*. В ряде работ была показана изменчивость морфологических и физиологических признаков и несостоятельность их использования в качестве единственного критерия для видовой дифференциации дрожжей (Scheda, Yarrow, 1966, 1968; Наумов, Юркевич, 1970). Это привело к тому, что в изданном в 1984 году определителе, все дрожжи *Saccharomyces sensu stricto* были отнесены к одному виду *S. cerevisiae* с более, чем 80 синонимами (Yarrow, 1984).

Проведённая ревизия существенно затрудняла работу прикладных микробиологов, использующих старые названия, отражающие физиолого-биохимические свойства дрожжей. В работе Наумова Г.И. (1989) была предложена дифференциация культурных штаммов дрожжей *S. cerevisiae* на 6 групп культураров: *Cerevisiae*, *Ellipsoideus*, *Cheresanus*, *Diastaticus*, *Logos*, *Oviformis*. Группа *Cerevisiae* объединила пивные, спиртовые и хлебопекарские штаммы. Для этой группы характерна ферментация галактозы (Gal^+), мальтозы (Mal^+), сахарозы и рафинозы (Suc^+), а также неспособность ферментации мелибиозы (Mel^-) и растворимого крахмала (Sta^-). Исключением являются редко встречающиеся естественные мутанты Mal^- и Suc^- . Для дрожжей этой группы характерно накопление полимерных генов *MAL*. Группа *Ellipsoideus* включает в себя штаммы первичного виноделия, которые ранее были описаны как *S. ellipsoideus* Hansen. Синонимы: *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (Hansen) Dekker, *S. vini* Meyen ex Kudriavzev. Отношение к сахарам у представителей этой группы такое же,

как и у группы *Cerevisiae*. Группа *Cheresanus* объединила дрожжи вторичного виноделия, которые за счёт окисления этилового спирта образуют на вине хересную плёнку. К этой группе были отнесены виды ранее известные под названиями: *S. aceti* Santa Maria, *S. beticus* Marcilla et al ex Santa Maria, *S. cheresiensis* Prostoserdov et Afrikan, *S. cordubensis* Santa Maria, *S. gaditensis* Santa Maria, *S. hispanica* Santa Maria, *S. oviformis* var. *cheresiensis* (Prostoserdov et Afrikan) Kudriavzev, *S. oxidans* Santa Maria. Для штаммов этой группы характерен фенотип Gal⁻, отношение к другим сахарам не отличается от первых двух групп. Группа *Oviformis* – винные дрожжи, устойчивые к повышенной концентрации этилового спирта и сульфитов. Для этих дрожжей характерно отсутствие фермента сбраживающего галактозу. Отношение к другим диагностическим сахарам следующее: Mal⁺, Suc⁺, Mel⁻, Sta⁻. Характерно накопление множественных мутантов *gal* (Наумов, 1985). Сбраживающие растворимый крахмал дрожжи *Diastaticus* способны вызывать инфекцию на пивных заводах. Ферментация декстринов у этих дрожжей контролируется накапливающимися в геноме полимерными генами. Отношение этих дрожжей к сахарам следующее: Gal⁺, Mal⁺, Suc⁺, Sta⁺, Mel⁻. Группа *Logos* характеризуется способностью сбраживать мелибиозу. Эти дрожжи также известны под названиями: *S. coreanus* Saito, *S. hienipiensis* Santa Maria, *S. italicus* Castelli var. *melibiosi* van Uden et Assis–Lopes, *S. norbensis* Santa Maria, *S. oleaceus* Santa Maria, *S. oleaginosus* Santa Maria. Штаммы этой группы различаются по признакам Gal, Mal, Suc. Отмечено накопление полимерных генов *MEL* (Наумов, 1985).

С 70-х годов прошлого века в систематике дрожжей *Saccharomyces* начинают использовать молекулярные методы и гибридологический анализ.

1.2. ДНК-ДНК реассоциация и гибридологический анализ

Способность восстановления двойной спирали ДНК после её денатурации, легла в основу метода определения родства организмов с помощью ДНК-ДНК реассоциации. Так, одноцепочечные молекулы ДНК

двух различных штаммов могут образовывать гибридные двуцепочечные молекулы. Этот метод позволяет установить степень гомологии ДНК на достаточно протяжённых участках цепи. Во второй половине прошлого века этот метод использовался в качестве золотого стандарта в систематике дрожжей. На основании сравнения видов дрожжей различных родов была предложена шкала, согласно которой, штаммы имеющие 80–100% сходства ДНК являются конспецифичными, т. е. относятся к одному виду. Низкие значения реассоциации ДНК (0–30%) свидетельствуют о принадлежности дрожжей к разным видам. В случае промежуточного уровня ДНК-ДНК реассоциации (60–70%) исследуемые штаммы могут представлять собой как разные виды, так и один вид или разновидности одного вида (Price et al., 1978; Михайлова и др., 2009).

С помощью ДНК-ДНК реассоциации было показано, что штаммы, утилизирующие различные сахара, часто имеют высокий уровень гомологии геномов, в то время как штаммы, имеющие одинаковый физиологический спектр, могут иметь совершенно разные геномы (Price et al., 1978). Однако, метод ДНК-ДНК реассоциации имеет существенные ограничения, он подходит для сравнения только близкородственных видов и не может быть использован для сравнения таксонов более высокого ранга.

Одновременно с ДНК-ДНК реассоциацией в таксономии дрожжей *Saccharomyces* начали активно использовать гибридологический анализ. Датский генетик Winge, имеющий большой опыт в генетике растений и животных, впервые охарактеризовал наличие репродуктивно-генетической изоляции некоторых дрожжей (Naumov, 1996). Winge и Laustsen пришли к выводу, что способность к спариванию и показатель жизнеспособности аскоспор могут использоваться в качестве критерия для дифференциации видов в пределах рода *Saccharomyces* и предложили изучать жизнеспособность спор родительских штаммов в качестве контроля (Winge, Laustsen, 1939). Важным недостатком указанного метода было то, что природные и, особенно промышленные штаммы, часто бывают

анеуплоидными или полиплоидными и, как следствие, имеют низкую жизнеспособность аскоспор. Для достоверной оценки родства штаммов Наумовым Г.И. было предложено использовать в гибридологическом анализе специально созданные инбредные линии с высокой выживаемостью аскоспор (Naumov, 1996). На примере дрожжей *Saccharomyces* были разработаны генетические принципы определения видовой принадлежности дрожжей:

- 1) Создание высокофертильных инбредных линий родительских культур.
- 2) Маркирование родительских линий индуцированными ауксотрофными мутациями или использование природных генетических маркеров – способности ферментировать различные сахара.
- 3) Контроль мейоза у гибридов.
- 4) Генетический анализ гибридов: изучение жизнеспособности аскоспор и поведения контрольных маркеров.

Предложенные генетические принципы применимы как к гомоталличным, так и к гетероталличным штаммам (рис. 1).

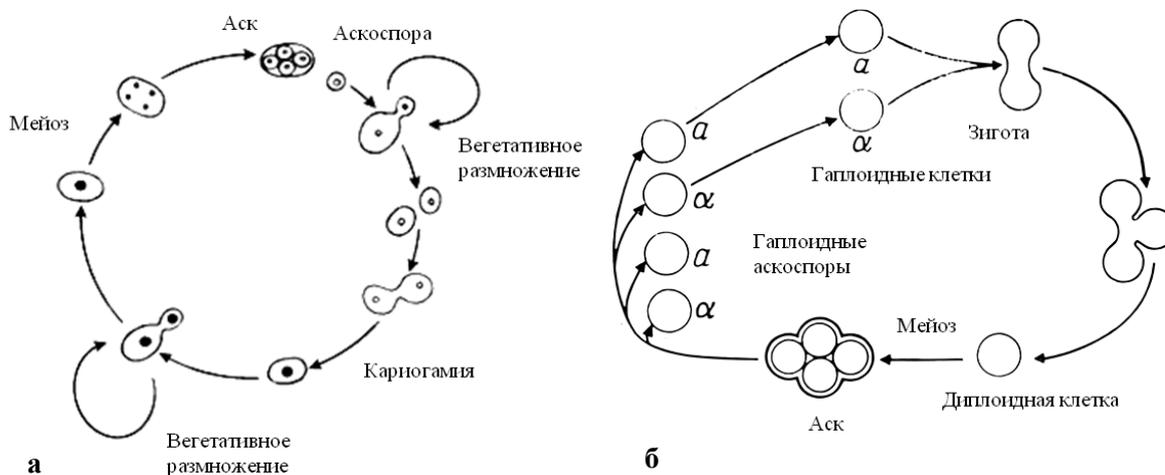


Рисунок 1. Жизненный цикл гомоталличных (а) и гетероталличных (б) штаммов дрожжей *S. cerevisiae*.

1.2.1. Вид *Saccharomyces cerevisiae*

С помощью ДНК-ДНК реассоциации было изучено родство типовых культур 48 видов комплекса *Saccharomyces sensu stricto* с типовой культурой

S. cerevisiae CBS 1171 (Vaughan-Martini, Kurtzman, 1985; Vaughan-Martini, Martini, 1987). По уровню гомологии изученные штаммы разделились на три группы с видовыми обозначениями согласно van der Walt (1970): “*cerevisiae*” (86–100%), “*bayanus*” (3–24%) и “*pastorianus*” (19–71%). Гибридологический анализ штаммов первой группы подтвердил их близкое генетическое родство и принадлежность к одному биологическому виду *S. cerevisiae* (Наумов, 1986; Наумов и др., 1983; 1987). Согласно Maug (1942), биологический вид – это группа скрещивающихся между собой природных популяций, репродуктивно изолированных от таких же групп.

По результатам ДНК-ДНК реассоциации и гибридологического анализа к синонимам *S. cerevisiae* были отнесены следующие таксономические виды: *S. acetii* Santa Maria, *S. beticus* Marcilla et al ex Santa Maria, *S. capensis* van der Walt et Tscheuscher, *S. cheresiensis* Prostoserdov et Afrikian, *S. chevalieri* Guilliermond, *S. cordubensis* Santa Maria, *S. coreanus* Saito, *S. diastaticus* Andrews et Gilliland ex van der Walt, *S. ellipsoideus* Hansen, *S. gaditensis* Santa Maria, *S. hienipiensis* Santa Maria, *S. hispalensis* Santa Maria, *S. hispanica* Santa Maria, *S. italicus* Castelli, *S. lindneri* Guilliermond, *S. logos* van Laer et Denamur ex Jorgensen, *S. norbensis* Santa Maria, *S. odessa* Schnegg et Oehlkers, *S. oleaceus* Santa Maria, *S. oleaginosus* Santa Maria, *S. oviformis* Osterwalder, *S. prostoserdovii* Kudriavzev, *S. steineri* Lodder et Kreger-van Rij и *Candida robusta* Diddens et Lodder.

1.2.2. Вид *Saccharomyces bayanus*

Еще в 70-е годы на материале грузинских и молдавских винных штаммов были установлены физиологические и биохимические особенности, такие как криотолерантность, накопление глицерина и другие, дрожжей *S. uvarum* (Арабидзе, 1968; Баштанная, 1970).

Одновременно с помощью ДНК-ДНК реассоциации была установлена низкая гомология (всего 40%) между типовыми культурами дрожжей *S. uvarum* и *S. cerevisiae* (Bicknell, Douglas, 1970). Позже другие исследователи

(Rosini et al., 1982) показали, что типовые культуры видов *S. bayanus* и *S. uvarum* имеют 98% ДНК-ДНК гомологии. Принимая во внимание тот факт, что *S. bayanus* был описан раньше, видовое название *S. uvarum* стали считать его синонимом. ДНК-ДНК реассоциация типовой культуры *S. bayanus* CBS 380 и остальных таксономических видов из группы “*bayanus*” выявила их близкое генетическое родство – 86–100% (Vaughan-Martini, Kurtzman, 1985; Vaughan-Martini, Martini, 1987). Таким образом, в список синонимов *S. bayanus* вошли еще и другие виды: *S. abuliensis* Santa Maria, *S. globus* Osterwalder, *S. heterogenicus* Osterwalder, *S. intermedius* var. *valdensis* Osterwalder, *S. inusitatus* van der Walt и *S. uvarum* Beijerinck. Гибридологическим анализом было подтверждено существование биологического вида *S. bayanus*: гибриды *S. bayanus* × *S. cerevisiae* были полностью стерильны (Naumov, 1987).

Типовая культура *S. carlsbergensis* CBS 1513, выделенная Hansen в 1908 году из пива низового брожения, имела промежуточные значения сходства в опытах по ДНК-ДНК реассоциации с типовыми культурами *S. cerevisiae* и *S. bayanus*: 57 и 72% соответственно (Vaughan-Martini, Kurtzman, 1985). Это косвенно указывало на то, что пивные дрожжи *S. carlsbergensis* являются межвидовым гибридом *S. cerevisiae* × *S. bayanus*. Изучение большего количества штаммов пивных дрожжей, включая типовую культуру *S. pastorianus* Hansen 1904 (CBS 1538), подтвердило гибридное происхождение пивных дрожжей низового брожения (Vaughan-Martini, Martini, 1987). Типовые культуры CBS 1513 и CBS 1538 имеют 93% сходства по ДНК-ДНК реассоциации. Поскольку *S. pastorianus* был описан на 4 года раньше, вид *S. carlsbergensis* был признан его синонимом.

1.2.3. Вид *Saccharomyces paradoxus*

Этот вид был описан в начале прошлого века на материале двух штаммов, выделенных из сокотечения дуба *Quercus pedunculata*, в Санкт-Петербурге и коры вяза *Ulmus campestris* в Полтавской области (Бачинская,

1914). Позднее *S. paradoxus* был включен в список синонимов *S. cerevisiae* (Yarrow, 1984).

Генетическое исследование семи штаммов *S. cerevisiae* var. *terrestris*, выделенных из лесной почвы в Дании (Jensen, 1967), показало, что они образуют фертильные гибриды друг с другом (жизнеспособность аскоспор 70%) и стерильные гибриды с эталонным штаммом *S. cerevisiae* (Наумов, 1979). В 80-е годы прошлого века был проведен масштабный гибридологический анализ таксономических видов *S. cerevisiae* var. *terrestris*, *S. cerevisiae* var. *tetrasporus* и *S. paradoxus* на материале коллекционных штаммов и изолятов, выделенных из сокоотечений дубов в разных регионах бывшего Советского Союза (Наумов, 1986, 1988, 1989; Naumov, 1987). Все проанализированные гибриды были фертильными и имели регулярное расщепление ауксотрофных маркеров. При этом гибриды с видовым тестером биологического вида *S. cerevisiae* были полностью стерильными. Принимая во внимание приоритетность описания вида *S. paradoxus*, разновидности *S. cerevisiae* var. *terrestris* и *S. cerevisiae* var. *tetrasporus* были отнесены к его синонимам. В качестве типовой культуры был предложен штамм *S. paradoxus* CBS 432. С помощью гибридологического анализа к синонимам *S. paradoxus* были отнесены таксономический вид *S. mangini* var. *tetrasporus* и формально не описанный вид *S. douglasii* (nom. nud.) (Наумов, Наумова, 1990; Naumov et al. 1992). Межвидовые гибриды *S. paradoxus* × *S. bayanus* были стерильными (Naumov, 1987, 1996); поэтому было предложено восстановить *S. paradoxus* в качестве отдельного биологического вида. Результаты гибридологического анализа были подтверждены в опытах по ДНК-ДНК реассоциации (Vaughan-Martini, 1989). Изученные штаммы *S. paradoxus*, *S. cerevisiae* var. *terrestris* и *S. cerevisiae* var. *tetrasporus* имели высокий уровень сходства по ДНК-ДНК реассоциации – 75–95%, тогда как их гомология с типовыми культурами видов *S. cerevisiae*, *S. bayanus* и *S. pastorianus* была значительно ниже: 46–59, 0–33 и 8–29% соответственно.

На основании гибридологического анализа и ДНК-ДНК реассоциации биологический вид *S. paradoxus* включает следующие синонимы: *S. mangini* var. *tetrasporus* (Beijerinck) Stelling-Dekker, *S. cerevisiae* var. *tetrasporus* (Beijerinck) Phaff et al., *S. cerevisiae* var. *terrestris* Jensen и *S. douglasii* (nom. nud.) (Наумов, 1979, 1986; Наумов, Наумова, 1990; Vaughan Martini, 1989).

1.2.4. Виды *Saccharomyces cariocanus*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae*

Еще три новых вида рода *Saccharomyces* сначала были идентифицированы как генетически изолированные популяции: две в Японии и одна в Бразилии (Naumov et al., 1995a, b). С помощью гибридологического анализа было установлено, что штаммы этих популяций образовывали стерильные гибриды как между собой, так и с видовыми тестерами дрожжей *S. cerevisiae*, *S. bayanus* и *S. paradoxus*. Внутрипопуляционные гибриды были высокофертильны и имели регулярное мейотическое расщепление ауксотрофных маркеров. С помощью гибридологического анализа, молекулярного кариотипирования и филогенетического анализа гена 18S рРНК и внутренних транскрибируемых спейсеров ITS были формально описаны три новых вида: *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae* (Naumov et al., 2000).

Генетическое родство новых видов между собой и с типовыми культурами *S. cerevisiae*, *S. bayanus* и *S. paradoxus* было изучено с помощью ДНК-ДНК реассоциации (Михайлова и др., 2009). Уровень ДНК-ДНК реассоциации внутри каждого из новых видов был высоким и составил 88–100%. Для дрожжей *S. kudriavzevii* характерна низкая ДНК гомология с остальными биологическими видами: 25–35%. Уровень ДНК-ДНК реассоциации *S. mikatae* составил, соответственно, 25, 27 и 32% с *S. kudriavzevii*, *S. cerevisiae* и *S. paradoxus*. Гомология ДНК с *S. bayanus* и *S. cariocanus* была выше: 48 и 50%. Исключением является комбинация *S. cariocanus/S. paradoxus* с уровнем ДНК-ДНК реассоциации 99% (Михайлова и др., 2009). Однако, несмотря на высокий уровень ДНК гомологии, дрожжи

S. cariocanus образуют стерильные гибриды с *S. paradoxus*, имеют видоспецифичный молекулярный кариотип и характеризуются уникальной нуклеотидной заменой в консервативном гене 18S рРНК, не обнаруженной у остальных 5 видов рода *Saccharomyces* (Naumov et al., 2000).

1.3. Филогенетический анализ

В 80–90-е годы прошлого века в систематике дрожжей начали активно использовать анализ последовательностей генов рибосомальной РНК, который позволял устанавливать генетическое родство дрожжей на различных таксономических уровнях. Рибосомы присутствуют у всех клеточных организмов и имеют общее эволюционное происхождение, что обеспечивает общую «молекулярную историю» всех организмов. При этом некоторые последовательности рРНК достаточно консервативны и могут служить контрольными («отправными») участками для выравнивания более переменчивых последовательностей рДНК-цистрона, которые используются для оценки эволюционного родства организмов (Blanz, Unsel, 1987; Kurtzman et al., 2011). Так, для дрожжей было показано, что у 5' конца гена 26S рРНК расположен участок размером 300 нуклеотидов, уровень изменчивости которого позволяет разделять близкие виды родов *Issatchenkia*, *Pichia* и *Saccharomyces* (Petersen, Kurtzman, 1991). Позднее, для видовой дифференциации было предложено использовать переменчивый участок в 600 нуклеотидов, включающий домен D1/D2 26S рРНК. Проведенное в 1998 году секвенирование всех известных на тот момент видов аскомицетных дрожжей показало, что различия более чем по 6 нуклеотидам в районе D1/D2 свидетельствуют о принадлежности штаммов к разным видам. Штаммы, последовательности которых идентичны или имеют 1–3 замены, как правило, конспецифичны (Kurtzman, Robnett, 1998; Kurtzman et al., 2011).

По результатам секвенирования домена D1/D2 26S рДНК более 600 видов аскомицетных дрожжей были разделены на 10 клад (Kurtzman, Robnett, 1998). В кладу «*Saccharomyces*» попали дрожжи следующих родов:

Saccharomyces, *Arxiozyma*, *Eremothecium*, *Hanseniaspora*, *Kluveromyces*, *Torulaspota*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, а также несколько видов рода *Candida*, способных ферментировать пищевые продукты и напитки. С помощью комплексного мультигенного филогенетического анализа ряда ядерных (18S рРНК, 5.8-ITS-фрагментов рДНК, 26S рДНК и EF-1К-участка) и митохондриальных (митохондриальная рДНК с малой субъединицей и геном *COX2*) генов была проведена кардинальная таксономическая ревизия клады «*Saccharomyces*» (Kurtzman, 2003). В результате 75 видов клады «*Saccharomyces*» были разделены на 14 кластеров, на основании которых были предложены 14 родов (Kurtzman, 2003). Девять из четырнадцати кластеров соответствовали ранее известным родам: *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Tetrapisispora*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Kluveromyces*, *Eremothecium*, *Hanseniaspora*, *Saccharomycodes*. На основании других пяти кластеров были созданы новые роды: *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumoviozyma*, *Vanderwaltozyma* и *Zygotorulaspota*. В подвергнувшемся ревизии роде *Saccharomyces* остались только дрожжи *Saccharomyces sensu stricto*.

На основании филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 26S рДНК и ITS-участка (ITS1/ITS2 и ген 5.8S рРНК) три штамма, выделенные из коры дерева семейства *Fagaceae* в Китае, были отнесены к новому виду *S. arboricola* (Wang, Bai, 2008). С помощью гибридологического анализа был подтвержден статус биологического вида дрожжей *S. arboricola* (Naumov et al., 2010).

Недавно был описан еще один новый вид *Saccharomyces* – *S. jurei* (Naseeb et al., 2017). Генетическая изоляция *S. jurei* от остальных видов рода *Saccharomyces* была продемонстрирована с помощью филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 гена 26S рРНК и внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS), а также гибридологическим анализом.

Таким образом, в настоящее время род *Saccharomyces* включает 8 биологических видов: *S. cerevisiae* (типовой вид рода), *S. bayanus*, *S.*

paradoxus, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. arboricola*, *S. jurei*, а также гибридный видовой таксон *S. pastorianus*. В данной работе в пределах рода *Saccharomyces* будут рассматриваться только биологические виды.

1.4. Молекулярная дифференциация дрожжей видов рода *Saccharomyces*

1.4.1. ПДРФ-анализ 5.8S- ITS-фрагмента и межгенного спейсера IGS2

Для дифференциации близких видов и внутривидовых популяций грибов используют рестрикционный анализ амплифицированных участков рДНК, чаще всего 5.8S-ITS-участка и межгенного спейсера IGS2. ПДРФ-анализ основан на наличии в геномной ДНК сайтов рестрикции, расщепляемых соответствующей рестриктазой. В результате образуется определенный набор фрагментов ДНК, число и размеры которых соответствуют расположению сайтов рестрикции и представляют собой так называемый ПДРФ-профиль.

Метод ПДРФ-анализа межгенного спейсера IGS2 позволяет дифференцировать *S. cerevisiae* и гибридный таксон *S. pastorianus/S. carlsbergensis* (Molina et al., 1993). С помощью ПДРФ-анализа этого участка были выявлены две группы штаммов внутри вида *S. bayanus*: *S. bayanus* var. *ivarum* и *S. bayanus* var. *bayanus* (Nguyen, Gaillardin, 1997). Дрожжи *S. bayanus* var. *ivarum* ассоциированы с виноделием и виноградарством при пониженных температурах, в то время как группа *S. bayanus* var. *bayanus* представлена, в основном, штаммами, загрязняющими пивоварение (Masneuf-Pomarede et al., 2007; Almeida et al., 2014; Naumova et al., 2005; Pérez-Través et al., 2014).

Виды рода *Saccharomyces* различаются последовательностями внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 рДНК и могут быть дифференцированы на основании анализа длин фрагментов рестрикции этого участка. С помощью эндонуклеаз *Hae*III и *Hpa*II можно дифференцировать

дрожжи *S. cerevisiae* от групп видов *S. paradoxus/S. cariocanus*, *S. bayanus/S. kudriavzevii* и *S. arboricola/S. mikatae* (Серпова и др., 2011). Внутри каждой из групп виды можно различить по молекулярным кариотипам.

1.4.2. Молекулярное кариотипирование и Саузерн-гибридизация

Хромосомы дрожжей обладают малыми размерами и поэтому их изучение невозможно с помощью световой и даже электронной микроскопии. Метод пульс-электрофореза нативных хромосомных ДНК (молекулярное кариотипирование) позволяет получать важную информацию о хромосомном составе геномов дрожжей.

С помощью стандартных методов гель-электрофореза ранее было невозможно разделить большие молекулы ДНК, так как они перемещались в геле вместе независимо от размера. В 1984 году в Колумбийском университете была разработана оригинальная методика экстрагирования интактной хромосомной ДНК из клеток дрожжей, помещённых в блоки легкоплавкой агарозы, а также сконструирован аппарат для пульс-электрофореза (Schwartz, Cantor, 1984). В процессе пульс-электрофореза молекулы ДНК продвигаются в агарозном геле под воздействием попеременно переключающихся электрических полей, ориентированных относительно друг друга под углом 120°. В результате молекулы ДНК меняют ориентацию после каждого переключения полей. Для хромосомных ДНК больших размеров необходимо больше времени на смену ориентации и, следовательно, они продвигаются в агарозном геле медленнее, чем более короткие молекулы хромосомных ДНК. С помощью пульс-электрофореза авторам удалось разделить 11 хромосомных полос у дрожжей *S. cerevisiae*. Позднее были разделены все 16 хромосом у этих дрожжей (Chu, Gunderson, 1991). Молекулярное кариотипирование и последующая Саузерн-гибридизация хромосомной ДНК с молекулярными зондами, расположенными на разных хромосомах, позволили определить у лабораторных штаммов *S. cerevisiae* соответствие всех электрофоретических

полос конкретным хромосомам, ранее идентифицированным в рекомбинационном анализе, а именно 16 групп сцепления (Mortimer et al., 1992). Было установлено, что виды *S. cerevisiae*, *S. bayanus* и *S. paradoxus* обладают общими кариотипическими характеристиками: гаплоидное число хромосом равно 16 и одинаковые предельные размеры хромосомных полос от 250 до 2200 т.п.н. (Naumov et al., 1992). Молекулярные кариотипы дрожжей *S. paradoxus* и диких штаммов *S. cerevisiae* очень похожи, тогда как дрожжи *S. bayanus* обладают видоспецифичным кариотипом. С помощью молекулярного кариотипирования можно также дифференцировать разновидности *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. bayanus* var. *ivarum* (Наумова и др., 1991; Nguyen, Gaillardin, 1997). По молекулярным кариотипам *S. kudriavzevii* неотличимы от дрожжей *S. cerevisiae* и *S. paradoxus*, тогда как штаммы *S. mikatae* и, особенно, *S. cariocanus*. имеют уникальные кариотипы (Naumov et al., 1995, 2000).

1.4.3. Видоспецифичные праймеры

На базе полноразмерных геномов дрожжей *Saccharomyces*, в работе Muir et al. (2011) впервые был разработан метод ПЦР с мульти-праймерами, для дифференциации видов внутри этого рода. Суть метода состоит в подборе и амплификации последовательностей, характерных для конкретного вида *Saccharomyces* за одну реакцию ПЦР. Подбор праймеров для идентификации того или иного вида сахаромикетов состоял в том, что это должны быть олигонуклеотиды для амплификации генов (или последовательностей), которые обязательно присутствуют у всех членов данного вида и отсутствуют у остальных видов. По нуклеотидным последовательностям шести генов (*SEC31*, *SEC24*, *FAL1*, *PR11*, *MEX67*, *DBP6*), были созданы праймеры, позволяющие получать ампликон, размер которого одинаковый у всех исследуемых штаммов одного конкретного вида. Это позволило дифференцировать виды *Saccharomyces* по наличию или отсутствию ПЦР-полосы определенного размера. Так для штаммов *S.*

cerevisiae характерна полоса размером 150 п.н., а для вида *S. bayanus* – 275 п.н. (Muir et al., 2011).

1.5. Дивергенция геномов видов рода *Saccharomyces*

1.5.1. Сравнительный анализ геномов

1.5.1.1. Вид *Saccharomyces cerevisiae*

В 1989 году стартовал европейский проект «Геном дрожжей». Объектом полногеномного секвенирования стал гетероталличный штамм дрожжей *S. cerevisiae* S288C. В 1996 году был опубликован аннотированный геном этого штамма, – первого эукариотического организма (Goffeau et al., 1996). Впоследствии, геном дрожжей S288C стал использоваться в качестве эталона в исследованиях различных эукариот, включая человека. Электронная база генома дрожжей (YGD) стала доступна с 24 апреля 1996 г. (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>).

Штамм *S. cerevisiae* S288C является лабораторной генетической линией, полученной в результате серии скрещиваний различных штаммов *S. cerevisiae*: EM93, EM126, NRRL YB-210 и пекарских штаммов Yeast Foam, FLD и LK. Примерно 90% генома S288C составляет геном штамма EM93, изолированного Emil Mraek в 1938 году из гниющего инжира в Калифорнии (Mortimer, Johnston, 1986). С помощью Саузерн-гибридизации ДНК штаммов S288C и EM93 были установлены протяженные участки гомологии, особенно для хромосом IV(R) и XII(R) (Esberg et al., 2011).

Родословная генетической линии S288C хорошо изучена (Mortimer, Johnston, 1986). Полный геном этого штамма содержит около 6300 открытых рамок считывания. Принимая во внимание синонимичные кодоны и другие критерии, предположительно, около 5800 (93%) из них действительно являются генами (Журавлева и др., 2000). В геноме дрожжей *S. cerevisiae* было выявлено 55 дублированных блоков, содержащих 376 пар гомологичных генов со средним показателем гомологии в парах 63% (Wolfe, Shields., 1997; Seoighe, Wolfe, 1998). Одинаковый порядок и ориентация

паралогичных генов у штамма S288C указывают на предковую дупликацию всего генома (Llorente et al., 2000).

После завершения международного проекта по секвенированию генома дрожжей *S. cerevisiae* (Goffeau et al., 1996) были определены полные нуклеотидные последовательности геномов *S. bayanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus* и проведено частичное секвенирование генома *S. cariocanus* (Kellis et al., 2003, 2004; Cliften et al., 2003; Dujon et al., 2004). Сравнительный анализ геномов подтвердил наиболее близкое генетическое родство между видами *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. cariocanus*, имеющих до 90% идентичности нуклеотидных последовательностей в кодирующих областях и до 80% сходства в не кодирующих последовательностях (Kellis et al., 2003; Liti et al., 2006). Полагают, что дрожжи *S. cerevisiae*, дивергировали от общего предка *S. paradoxus/S. cariocanus* около 5–10 миллионов лет назад (Kellis et al., 2003), тогда как последние виды разошлись позднее (Naumov et al., 2000a; Goddard, Burt, 1999). А виды *S. mikatae*, *S. kudriavzevii* и *S. bayanus* дивергировали от *S. cerevisiae* соответственно, 10–15, 15–20 и 20 миллионов лет назад (Kellis et al., 2003).

Сравнительный анализ геномных последовательностей более 20 видов аскомицетных дрожжей подтвердил, что геномы биологических видов рода *Saccharomyces* сформировались в результате предковой дупликации (ПДГ, Полная Дупликация Генома) и последующих массовых хромосомных перестроек и делеционных потерь отдельных генов примерно 100 миллионов лет назад (Fitzpatrick et al., 2006; Scannell et al., 2007). Одинаковое гаплоидное число хромосом ($n=16$) у всех видов рода *Saccharomyces* свидетельствует о том, что их расхождение с дрожжами *Lachancea (Kluyveromyces) waltii* произошло прежде, чем произошла дупликация предкового генома (Kellis et al., 2004). Souciet et al. (2009) провели сравнительный анализ геномов пяти протоплоидных (геномы не подвергались полной дупликации) видов *Lachancea (Kluyveromyces) thermotolerans*, *Lachancea (Saccharomyces) kluyveri*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Kluyveromyces lactis* и *Eremothecium*

(*Ashbya*) *gossypii*, относящихся к семейству Saccharomycetaceae. Было показано, что несмотря на эволюционные различия, указанные виды имеют общий коровый набор из 3300 семейств белков и высокую степень консервативной синтении (Souciet et al., 2009).

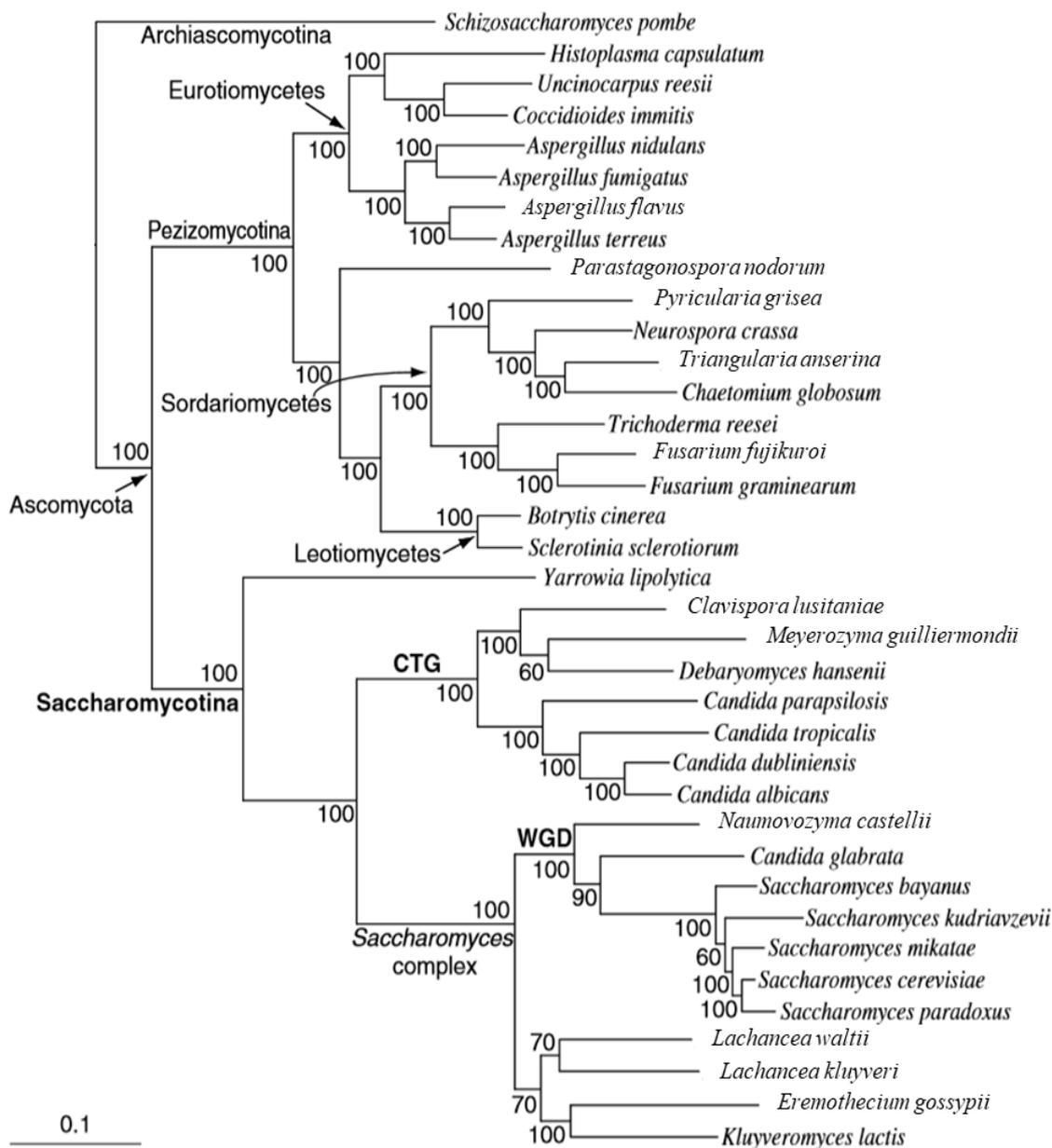


Рисунок 2. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей 153 ортологичных генов грибов из отдела Ascomycota (Scannell et al., 2007).

С помощью геномной гибридизации на микрочипах Schacherer et al. (2009) изучили популяционную структуру дрожжей *S. cerevisiae* на материале 63 штаммов различного экологического (пиво, хлеб,

виноградники, клинические изоляты, различные ферментационные процессы и природные изоляты) и географического (Европа, США, Япония, Китай, Индонезия и другие страны) происхождения. Было идентифицировано около двух миллионов однонуклеотидных замен (SNP, англ. Single Nucleotide Polymorphism) и около 4000 делеций. Причем, делеции обнаружены только в 4 из 1114 основных генов (*KRS1*, *PGS1*, *SMT3* и *ERG20*). Эти делеции затрагивают небольшую часть открытой рамки считывания, в результате чего гены могут оставаться функциональными. Проведённые скрещивания между штаммами имеющими делеции и референсным штаммом *S. cerevisiae* S288C показали высокую выживаемость гибридных аскоспор (около 90%), что указывает на функциональность делетированных генов (Schacherer et al., 2009). Делеции не равномерно распределены по геному, наиболее обогащёнными являются субтеломерные районы хромосом, где чаще всего расположены гены, отвечающие за транспорт и ферментацию различных сахаров. Изменчивость субтеломерных районов хромосом имеет большое эволюционное значение для адаптации дрожжей *Saccharomyces* к использованию различных источников углерода (Schacherer et al., 2007).

Практически одновременно была опубликована статья Liti et al. (2009) по частичному секвенированию геномов 36 штаммов *S. cerevisiae*. Авторы проанализировали 3413 однонуклеотидных замен, по которым изученные штаммы разделились на пять кластеров: Малайзия, Западная Африка, Северная Америка, sake и сходные ферментации, а также смешанный кластер, включающий штаммы различного происхождения, многие из которых выделены из виноделия в Европе (Liti et al., 2009).

Несмотря на значительную внутривидовую вариабельность генетических и фенотипических признаков, штаммы *S. cerevisiae* различного экологического и географического происхождения образуют между собой фертильные гибриды с нормальным расщеплением контрольных маркеров. В случае использования фертильных моноспоровых родительских штаммов *S. cerevisiae* их внутривидовые гибриды также высокофертильны – с 50–100%

выживаемостью аскоспор (Наумов и др., 1983; Наумов, Никоненко, 1988; Наумов, Наумова, 2011). Известен только один случай пониженной фертильности гибридов с участием штаммов *S. cerevisiae*, выделенных из нектара пальмы Бертрама в Малайзии (Наумов и др., 2006). При скрещивании с эталонным штаммом *S. cerevisiae* эти штаммы образовывали гибриды с низкой выживаемостью аскоспор (5–8%), что указывает на высокую генетическую дивергенцию малазийской популяции. Установлено, что в ходе эволюции геном малазийских штаммов подвергся значительным перестройкам: 14 хромосомных транслокаций и от 6 до 8 инверсий на геном (O'Donnell et al., 2003).

Muller et al. (2011) с помощью геномной гибридизации сравнили геномы 88 штаммов *S. cerevisiae* различного происхождения: из ферментационных процессов, природные и клинические изоляты. Было идентифицировано несколько генетических локусов, связанных с клиническими характеристиками: образование псевдомицелия, плотная клеточная оболочка и другие. Последующий анализ популяционной структуры дрожжей *S. cerevisiae* проводили с помощью полногеномного секвенирования. Strobe et al. (2015) сравнили геномы 100 штаммов *S. cerevisiae* различного происхождения, включая клинические изоляты. В геноме некоторых штаммов *S. cerevisiae* были выявлены гены родственного вида дрожжей *S. paradoxus* (Muller et al., 2011; Strobe et al., 2015). Принимая во внимание наличие общей системы типов спаривания у видов рода *Saccharomyces*, эти гены попали в геном штаммов *S. cerevisiae* посредством гибридизации и последующей рекомбинации (Dujon, 2005).

Масштабное исследование 1000 геномов *S. cerevisiae* было проведено Peter et al. (2018). Анализ результатов этого исследования также свидетельствует о дифференциации геномов *S. cerevisiae*, которая коррелирует с географией, экологической нишей и степенью одомашнивания. На основании филогенетического анализа единичных нуклеотидных замен (SNP) было выявлено 26 клад, в том числе: 10

одомашненных, 11 природных и пять клад без четкого обозначения. Исключение составляют лишь штаммы, выделенные из средиземноморского дуба, примкнувшие к группе одомашненных штаммов; и штаммы, выделенные из саке, входящие в группу природных штаммов. Штаммы, не относящиеся к этимкладам, были включены в три мозаичные группы. Анализ структуры геномов мозаичных штаммов выявил различные источники и степени мозаичности, причиной которых послужили многочисленные события внутривидовой гибридизации и процесс одомашнивания. Для штаммов, выделенных из саке и эля, характерна анеуплоидия хромосом: I, III и IX (Peter et al., 2018). Для культурных штаммов *S. cerevisiae* характерно чёткое разделение на две монофилетические группы: ферментации типа саке и классические ферментации (вино и другие) (Bergstrom et al., 2014; Han et al., 2021). Адаптация дрожжей к тем или иным условиям ферментации часто связана с однонуклеотидными заменами (SNP) в последовательности ДНК. Тем не менее, было установлено, что SNP представляют собой лишь небольшую часть генетических изменений, связанных с одомашниванием *S. cerevisiae* (Bergstrom et al., 2014; Steensels et al., 2019). Изменение числа копий определённых генов или локусов в результате делеций или дупликаций, большие структурные и кариотипические перестройки (инверсии, реципрокные транслокации, транзиции), горизонтальный перенос генов наряду с единичными нуклеотидными заменами являются широко распространёнными эволюционными механизмами у дрожжей *S. cerevisiae*.

Разделение культурных штаммов *S. cerevisiae* на группы указывает на единовременный процесс одомашнивания с последующими дополнительными событиями доместикации в разных регионах мира (Peter et al., 2018; Han et al., 2021; Bai et al., 2022). По мнению Han et al. (2021) одомашнивание дрожжей *S. cerevisiae* произошло в Китае. Многие авторы также высказываются в пользу гипотезы о восточноазиатском происхождении дрожжей *Saccharomyces*, выдвинутой ранее Наумовым Г.И.

(Naumov, 1988; Peter et al., 2018; Han et al., 2021). Следует отметить, что шесть из восьми известных биологических видов обнаружены в Дальневосточной Азии; не обнаружены только виды *S. jurei* и *S. cariocanus*.

Помимо интрогрессивных последовательностей *S. paradoxus*, в геноме винных дрожжей *S. cerevisiae* были обнаружены ортологичные гены филогенетически не родственных видов, которые выделяются на разных этапах ферментации вина: *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspota microellipsoides* и *Torulaspota delbrueckii* (Muller, McCusker., 2011; Strobe et al., 2015; Novo et al., 2009; Marsit et al., 2015; Gonzalez, Morales, 2022). Так, коммерческий винный штамм *S. cerevisiae* EC1118 в своём геноме имеет интрогрессивные последовательности дрожжей *Zygosaccharomyces bailii* (Novo et al., 2009). Была установлена корреляция между приобретёнными генами и адаптацией к специфическим условиям ферментации (Devia et al., 2020).

В настоящее время в базе данных GenBank имеется более полутора тысяч последовательностей геномов штаммов *S. cerevisiae* различного происхождения.

1.5.1.2. Вид *Saccharomyces paradoxus*

Дикие дрожжи *S. paradoxus*, впервые выделенные и изученные в России (Бачинская, 1914; Надсон, Красильников, 1925; Кудрявцев, 1938, 1954; Косиков, Бочаров, 1961; Наумов, 1986), являются самыми ближайшими родственниками культурных дрожжей *S. cerevisiae*. Дрожжи *S. paradoxus* выделяются в разных регионах мира из природных источников: сокотечения широколиственных деревьев, в основном дубов, почвы, лесной подстилки, насекомых и других. В отличие от *S. cerevisiae*, этот вид подразделен на четыре географические популяции с разным уровнем дивергенции: европейская, дальневосточно-азиатская, североамериканская и гавайская (Наумов 1986, 1999, 2013; Koufopanou et al., 2006; Liti et al., 2009; Eberlein et al., 2019). Гибридологический анализ показал, что жизнеспособность

аскоспор у гибридов зависит от географического происхождения родительских штаммов. В межпопуляционных скрещиваниях была показана пониженная фертильность гибридных аскоспор (3–55%), в то время как внутрипопуляционные гибриды высокофертильны (Наумов, 1999; Наумов и др., 1996, 1997, 1998). Гибриды штаммов всех четырех популяций с дрожжами *S. cerevisiae* полностью стерильны (Наумов, 1999; Наумов и др., 1996). С помощью мультилокусного изоферментного анализа выявлены значительные генетические различия между штаммами европейской и дальневосточной популяций (Naumov et al., 1997a). Анализ последовательностей хромосомы III у штаммов европейской и дальневосточной популяций, показал, что общая дивергенция между ними составляет примерно 1.4%, а расхождение этих штаммов с *S. cariocanus* – 4% для обеих популяций (Bensasson et al., 2008). Liti et al. (2009) провели частичное секвенирование 35 геномов штаммов *S. paradoxus* различного географического происхождения. Сравнительный анализ 3413 однонуклеотидных замен также разделил исследуемые штаммы на четыре географические популяции. Показано, что геномы дрожжей *S. cariocanus* имеют большое сходство с геномами некоторых североамериканских штаммов *S. paradoxus* (Liti et al., 2009). Сравнительный анализ геномов штаммов различного географического происхождения выявил более близкое генетическое родство европейской и дальневосточной популяций (Kouforanou et al., 2020).

Yue et al. (2017) сравнили полноразмерные, подробно аннотированные, геномы 7 культурных штаммов *S. cerevisiae* и 5 природных изолятов *S. paradoxus*. Несмотря на близкое генетическое родство, обнаружены существенные различия в структурных перестройках генома у *S. cerevisiae* и *S. paradoxus*. Хромосомы *S. paradoxus* демонстрируют более быстрое накопление сбалансированных перестроек (инверсии, реципрокные транслокации и транспозиции), тогда как *S. cerevisiae* быстрее накапливает несбалансированные перестройки – новые вставки, делеции и дубликации.

Для субтеломерных районов обоих видов характерны межхромосомные обмены с более высоким темпом у *S. cerevisiae*, что, по-видимому, является результатом их одомашнивания (Yue et al., 2017).

Изучение геномов 27 штаммов дрожжей *S. paradoxus*, выделенных в Китае, показало, что большинство из них относится к дальневосточной популяции, а шесть штаммов значительно отличаются по ряду молекулярных маркеров (He et al., 2022). Ареалы обитания обоих типов штаммов перекрываются экологически и географически в зонах умеренного и субтропического климата Китая (He et al., 2022).

1.5.1.3. Комплексный вид *Saccharomyces bayanus*

С помощью различных молекулярных методов была выявлена гетерогенность биологического вида *S. bayanus*, включающего две группы «*bayanus*» и «*uvarum*», которые отличаются по рибосомным последовательностям (ITS1 и IGS2) и молекулярным кариотипам (Naumova et al., 2005; Nguyen, Gaillardin, 1997; Pérez-Través et al., 2014). Штаммы «*bayanus*» по ITS1-последовательностям не отличаются от гибридных дрожжей *S. pastorianus* и сходны с ними по молекулярным кариотипам, имея три и более хромосомных полос размером 245–370 т.п.н. Кариотипический профиль штаммов «*uvarum*» характеризуется наличием только двух хромосом этого размера.

Несмотря на то, что штаммы из двух групп имеют высокий уровень ДНК-ДНК реассоциации – 86–100%, они частично генетически изолированы (Vaughan-Martini, Kurtzman, 1985; Наумов, 2000; Naumova et al., 2005). Гибридологическим анализом показано, что выживаемость гибридных аскоспор, полученных от скрещивания штаммов «*bayanus*» и «*uvarum*» была пониженной (15–34%), тогда как внутрипопуляционные скрещивания были фертильными: выживаемость аскоспор 64% для «*bayanus*» и 91–100% для «*uvarum*» (Наумов, 2000; Naumov, 1996; Naumov et al., 2001). Во всех скрещиваниях наблюдалось регулярное мейотическое расщепление

ауксотрофных контрольных маркеров. Гибриды обеих популяций с тестерным штаммом *S. cerevisiae* были полностью стерильны (Наумов, 2000; Naumova et al., 2005). На основании гибридологического анализа и молекулярных данных было предложено признать существование двух разновидностей – *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. bayanus* var. *ivarum* (Наумов, 2000). К первой разновидности отнесены типовые культуры *S. bayanus* CBS 380, *S. globosus* CBS 424, *S. heterogenicus* CBS 425, *S. intermedius* var. *valdensis* CBS 1505 и *S. inusitatus* CBS 1546. Ко второй разновидности отнесены типовые культуры *S. ivarum* CBS 395, *S. abuliensis* CBS 7001 и *Saccharomyces tubiformis* CBS 431. Разделение вида *S. bayanus* на две разновидности принято в современных монографиях по систематике дрожжей (Vaughan-Martini, Martini, 2011). Специфической экологической нишей *S. bayanus* var. *ivarum* является виноделие и виноградарство при пониженных температурах. Эти дрожжи ассоциированы с производством белых, сладких и игристых вин, а также сидра (Naumov et al., 1993, 2000, 2001a,b; Masneuf-Pomarede et al., 2007; Almeida et al., 2014; Zhang et al., 2015; Rodríguez et al., 2017; McCarthy et al., 2021). Природные изоляты *S. bayanus* var. *ivarum* обнаружены во многих регионах мира: Испании, Словакии, Венгрии, Португалии, на Дальнем Востоке России, в США, Аргентине, Чили, Австралии и Новой Зеландии (Наумов и др., 2011; Almeida et al., 2011; Libkind et al., 2011). Дрожжи *S. bayanus* var. *bayanus* представлены, в основном, штаммами, загрязняющими пивоварение, включая типовую культуру CBS 380 (Naumova et al., 2005; Pérez-Través et al., 2014).

Однако, предложенная таксономическая ревизия была принята не всеми учеными. Некоторые авторы предлагают рассматривать указанные разновидности в качестве отдельных видов: *S. bayanus* и *S. ivarum* (Pulvirenti et al., 2000; Nguyen, Gaillardin, 2005; Rainieri et al., 2006). С помощью Саузерн-гибридизации и секвенирования отдельных генов было показано, что для *S. bayanus* var. *bayanus* характерно наличие субтеломерных последовательностей *S. cerevisiae*, включая гены ферментации различных

сахаров (Naumov et al., 1992; Nguyen et al., 2000; Naumova et al., 2005). Было показано, что штаммы этой разновидности, включая типовую культуру CBS 380, являются анеуплоидными и содержат дополнительные хромосомы (Kaneko, Banno, 1991; Naumova et al., 2005) и, поэтому, могут иметь гибридную природу (Nguyen et al., 2000). На этом основании было предложено закрыть вид *S. bayanus* как «неправильный» и восстановить не содержащий чужеродных последовательностей и дополнительных хромосом вид *S. uvarum* как таксономически «чистый» (Nguyen, Gaillardin, 2005; Nguyen et al., 2000; Rainieri et al., 1999). В качестве типовой культуры был предложен штамм CBS 7001 (МСУС 623), у которого определена полная нуклеотидная последовательность генома (Bon et al., 2000). С помощью ПДРФ-анализа 48 генов и частичного секвенирования 16 из них Rainieri et al. (2006) подтвердили гомогенность дрожжей *S. bayanus* var. *uvarum*. Среди дрожжей *S. bayanus* var. *bayanus* авторами также была обнаружена «чистая» линия: штамм NBRC 1948, выделенный из испорченного бочкового пива в Европе. Этот штамм был предложен в качестве новой типовой культуры вида *S. bayanus*. Однако, Nguyen et al. (2011) показали, что геном штамма NBRC 1948 является мозаичным и, помимо интрогрессивных субтеломерных фрагментов *S. cerevisiae*, отвечающих за транспорт мальтозы и мальтотриозы (MAL31 и MTY1), содержит последовательности *uvarum* и второго вида *S. bayanus*-типа, условно названного авторами *S. lagerae*.

Помимо штаммов *S. bayanus* var. *bayanus* (CBS 378, CBS 380, CBS 424, CBS 425, CBS 1505, CBS 1546, и CBS 3008), субтеломерные последовательности *Y'*, *SUC*, *RTM* и *MAL* дрожжей *S. cerevisiae* были обнаружены у двух венгерских штаммов NCAIM Y.00676 и NCAIM Y.00677, выделенных из домашнего спиртного напитка (Naumova et al., 2005, 2011). Согласно гибридологическому анализу последние два штамма относятся к *S. bayanus* var. *uvarum*: их гибриды с тестерным штаммом CBS 7001 были высокофертильны с 89–96% выживаемостью аскоспор (Naumova et al., 2011).

Штаммы NCAIM Y.00676 и NCAIM Y.00677 также имеют характерные для *S. bayanus* var. *ivarum* молекулярные кариотипы.

Родственные дрожжи *S. eubayanus* были описаны на изолятах, выделенных из коры *Nothofagus* и стромы *Cyttaria harioti* в Северо-Западной Патагонии, Аргентина (Libkind et al., 2011). Позднее эти дрожжи были изолированы в Китае, США, Канаде, Австралии и Новой Зеландии (Libkind et al., 2011; Bing et al., 2014; Peris et al., 2016; Gayevskiy, Goddard, 2016; Nespolo et al., 2020). На протяжении долгого времени в Европе геном *S. eubayanus* был обнаружен только у гибридных пивных дрожжей *S. pastorianus* (Baker et al., 2015; Hebly et al., 2015). Недавно были выделены европейские изоляты этих дрожжей на материале штаммов из лесистой местности в Дублине (Ирландия) (Bergin et al., 2022). Показано, что дрожжи *S. eubayanus* являются холодоустойчивыми и растут быстрее чем, *S. cerevisiae* при температурах ниже 10°C (Hebly et al., 2015), а также ассимилирует мальтозу, а не мальтотриозу (Hebly et al., 2015; Gibson et al., 2017).

Полногеномное секвенирование типовой культуры CBS 12357 и других штаммов *S. eubayanus* обнаружило их большое сходство с холодоустойчивым родителем пивных дрожжей *S. pastorianus* (Baker et al., 2015; Hebly et al., 2015; Samraio, 2018). Показано, что геном типовой культуры *S. bayanus* CBS 380 имеет большее сходство с *S. bayanus* var. *ivarum*, чем с типовой культурой *S. eubayanus*: 33% и 67% соответственно (Libkind et al., 2011). Напротив, выявлено большое сходство генома штамма NBRC 1948 с типовой культурой *S. eubayanus* CBS 12357 и холодоустойчивым геномом пивного коммерческого штамма Weihenstephan 34/70 (Pérez-Través et al., 2014; Libkind et al., 2011). Некоторое сходство обнаружено между геномами штаммов *S. bayanus* var. *ivarum* NCAIM Y.00676 и NCAIM Y.00677 и *S. eubayanus* CBS 12357 (Peris et al., 2014).

В последние годы дрожжи *S. eubayanus* активно изучаются в разных лабораториях мира. Проведено полногеномное секвенирование более 200 штаммов *S. eubayanus* различного географического происхождения.

Сравнительный анализ геномов выявил многослойную популяционную структуру этих дрожжей, состоящую из двух основных популяций, подразделенных на шесть субпопуляций. Четыре субпопуляции встречаются исключительно в Аргентине (Патагония); пятая – преимущественно в Патагонии, редко в Новой Зеландии и Северной Америке; шестая субпопуляция характерна для Голарктической экозоны (Langdon et al., 2020). Аргентинские штаммы *S. eubayanus* обладают наибольшим генетическим разнообразием (Langdon et al., 2020; Nespolo et al., 2020). На этом основании авторы полагают, что Аргентина (Патагония) является местом происхождения дрожжей *S. eubayanus* с последующим их распространением в другие регионы мира. В отличие от выделенных в Аргентине штаммов, американские изоляты не имеют четкой популяционной структуры (Peris et al., 2014). Филогенетический анализ однонуклеотидных замен (SNP) в 12 локусах (9 генов и 3 межгенных спейсера), выявил три популяции дрожжей *S. eubayanus* в Китае: тибетская, западнокитайская и сычуаньская (Bing et al., 2014). Из трех популяций, тибетская наиболее филогенетически родственная типовой культуре CBS 12357, выделенной в Патагонии (Аргентина), и имеет больше сходства с пивным коммерческим штаммом Weihenstephan 34/70, чем штаммы *S. eubayanus* из других регионов мира. На этом основании авторы считают, что именно тибетские, а не аргентинские штаммы являются донором не-*S. cerevisiae* родителя европейских лагерных пивных дрожжей.

Peris et al. (2016) провели сравнительный анализ геномов природных штаммов *S. eubayanus* различного географического происхождения и промышленных пивных дрожжей *S. pastorianus*. Показано, что ни один из изученных штаммов *S. eubayanus* не является единственным ближайшим родственником лагерных гибридов, что указывает на сложное происхождение пивных дрожжей.

Таксономический статус дрожжей *S. eubayanus* остается неясным. Обращает на себя внимание довольно низкая генетическая дивергенция таксонов *S. eubayanus* и *S. bayanus* var. *ivarum*, составляющая только 6–8%

различий в нуклеотидных последовательностях их геномов (Libkind et al., 2011). Такой низкий уровень различий не свойственен настоящим биологическим видам рода *Saccharomyces*. Более того, гибриды *S. eubayanus* × *S. bayanus* var. *ivarum* имеют выживаемость аскоспор 7–19% и регулярное мейотическое расщепление аутокотрофных контрольных маркеров (Наумов, 2017). Напротив, межвидовые гибриды биологических видов *Saccharomyces* полностью стерильны (Naumov et al., 2000, 2010; Naseeb et al., 2017).

Еще больше усложняет понимание таксономического статуса дрожжей *S. bayanus* обнаружение новозеландской популяции, штаммы которой по ряду молекулярных маркеров отличаются от *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *ivarum* и *S. eubayanus* (Almeida et al., 2014).

1.5.1.4. Виды *Saccharomyces cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. arboricola* и *S. jurei*

Культурные дрожжи *S. cerevisiae* и *S. bayanus* связаны с различными ферментационными процессами, а также встречаются в природе в разных регионах мира. Дрожжи *S. paradoxus* не связаны с хозяйственной деятельностью человека и обитают в природе повсеместно. Остальные пять видов рода *Saccharomyces* представлены ограниченным количеством штаммов и, как правило, приурочены к определенным географическим ареалам.

В настоящее время известно только два штамма *S. cariocanus*, которые изолированы в Бразилии (Morais et al., 1992; Naumov et al., 1995a). Полногеномные последовательности этих штаммов имеются в базе данных GenBank (Yue et al., 2017). По ряду молекулярных маркеров дрожжи *S. cariocanus* не отличаются от штаммов североамериканской популяции *S. paradoxus* (Liti et al., 2005, 2006). В то же время, штаммы *S. cariocanus* характеризуются видоспецифичным молекулярным кариотипом, уникальной нуклеотидной заменой в консервативном гене 18S рРНК и пост-зиготически изолированы от других видов *Saccharomyces* (Naumov et al., 2000a). Следует

отметить, что штаммы всех четырех географических популяций *S. paradoxus* не отличаются по молекулярным кариотипам и по 18S-последовательностям.

Дрожжи *S. mikatae* имеют ограниченное распространение и обнаружены только в Японии и Китае (Naumov et al., 2000a; Samraio, Gonçalves, 2017). В GenBank имеется ограниченная информация о полногеномных последовательностях дрожжей *S. mikatae*: депонированы геномы только трех штаммов (двух японских и одного китайского). Анализ полного митохондриального генома этих дрожжей показал, что кодирующие участки митохондриального генома более консервативны по сравнению с ядерным геномом (Ruan et al., 2017). Напротив, некодирующие участки митохондриального генома *S. mikatae*, как и остальных видов *Saccharomyces*, характеризуются более высокой скоростью перестроек по сравнению с ядерными геномами. Авторы связывают это с появлением аэробного ферментативного образа жизни у дрожжей *Saccharomyces*.

Для всех известных штаммов *S. mikatae* характерно наличие α -галактозидазных генов *MEL*, контролирующих сбраживание мелибиозы. У тринадцати штаммов, включая типовую культуру NBRC 1815, обнаружен один *MEL*-ген, расположенный в XV хромосоме. Штамм NBRC 10999 имеет дополнительный *MEL*-ген в XVI хромосоме (Наумова и др., 2011; Fischer et al., 2000). Liti et al. (2005) показали, что геномы остальных штаммов *S. mikatae* также имеют большое количество хромосомных полиморфизмов. Была показана большая вариабельность повторяющихся Ту-элементов и наличие у большинства штаммов Ту2-повторов, сходных с Ту2-повторами *S. cerevisiae* на 95%. Наиболее стабильными в геноме *S. mikatae* являются хромосомы I, III, IX и VIII (Liti et al., 2005).

Повышенный интерес к дрожжам *S. kudriavzevii* связан с их хорошей адаптацией к росту при низких температурах, повышенным уровнем синтеза глицерина и сниженным производством этанола, а также наличием других важных для виноделия физиологических свойств (Arroyo-López et al., 2010; Salvadó et al., 2011). На настоящий момент в базу данных GenBank

депонировано несколько геномов штаммов *S. kudriavzevii*, выделенных в Европе и Дальневосточной Азии (Scannell et al., 2011; Macías et al., 2019). Дрожжи *S. kudriavzevii* первоначально были описаны на материале японских изолятов (Naumov et al., 2000a), позднее штаммы этого вида были изолированы в Европе (Португалия, Испания) и на Тайване (Samraio, Gonçalves, 2008; Naumov et al., 2013). При скрещивании штаммов различного географического происхождения обнаружены существенные различия в фертильности гибридных аскоспор (Наумов, 2009; Naumov et al., 2013). Для гибридов японских и португальских штаммов с видовым тестером *S. kudriavzevii* NBRC 1802 выживаемость гибридных аскоспор варьировала от 61 до 90%. Аскоспоры гибридов тайваньских штаммов и NBRC 1802 имели пониженную выживаемость: 26–50% (Naumov et al., 2013). Дальневосточные и европейские штаммы отличаются по ряду молекулярных маркеров, например, по галактозным генам (Hittinger et al., 2004). В отличие от европейских штаммов, способных ферментировать галактозу, дальневосточные штаммы не способны усваивать этот сахар из-за обширных повреждений галактозных генов.

Вид *S. arboricola* был описан на материале трех штаммов, выделенных с коры дуба и каштанника в Китае (Wang, Bai, 2008). Позднее были обнаружены дополнительные изоляты этих дрожжей: один штамм на Тайване и девять в Новой Зеландии (Naumov et al., 2013; Gayevskiy, Goddard, 2016). Сравнительное геномное секвенирование выявило значительную дивергенцию новозеландских изолятов от китайских (Gayevskiy, Goddard, 2016). Сопоставление генома *S. arboricola* с геномом эталонного штамма *S. cerevisiae* S288C показало сходство их кариотипов, за исключением транслокации между правыми плечами IV и XIII хромосом, характерной для дрожжей *S. arboricola* (Liti et al., 2013). Также обнаружены две локальные перестройки в хромосомах VI и XIV.

До настоящего времени дрожжи *S. jurei* обнаружены только в Европе. Этот вид представлен 3 штаммами, выделенными во Франции и Германии

(Naseeb et al., 2017; Hutzler et al., 2021). Полногеномное секвенирование типовой культуры *S. jurei* выявило 5794 белок-кодирующих генов, аналогичных генам других видов *Saccharomyces* (Naseeb et al., 2018). Обнаружено 179 открытых рамок считывания, не представленных у других видов этого рода. Более того, четыре из них не имеют сходства ни с одним из доступных геномов (Naseeb et al., 2018). Несмотря на то, что дрожжи *S. jurei* выделены из природных источников, а не из промышленных ферментаций, показано их биотехнологическое значение. При условиях низких температур пивоварения эти дрожжи способны усваивать мальтозу и мальтотриозу, формируя при этом более сложный вкусовой профиль напитка (Hutzler et al., 2021; Giannakou et al., 2021).

1.5.2. Хромосомные перестройки: реципрокные транслокации

Реципрокная транслокация – это разрыв в негомологичных хромосомах с последующим взаимным (реципрокным) обменом повреждённых участков. При этом общее количество хромосом не изменяется. Крупные хромосомные перестройки, такие как реципрокные транслокации, характерны для биологических видов рода *Saccharomyces* и являются одним из механизмов их постзиготической изоляции (Naumov et al., 1992; Fischer et al., 2000; Naumova et al., 2005). На примере дрожжей *S. cerevisiae*, *Naumovozyma castellii* и *Candida glabrata* была показана реципрокная потеря дублированных генов в сотнях предковых локусов, которая способствовала процессу расхождения указанных трёх видов (Scannell et al., 2006). Сравнительный анализ молекулярных кариотипов дрожжей *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus* показал, что все три указанных вида имеют гаплоидное число хромосом, $n=16$ (Naumov et al., 1992). Позднее было проведено молекулярное кариотипирование дрожжей *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. arboricola* (Naumov et al., 1995 a, b). Все семь биологических видов имеют одинаковое гаплоидное число хромосом, равное 16 и предельные размеры хромосомных полос от 245 до 2200 т.п.н. Однако,

индивидуальные размеры каждой хромосомы могут варьировать у разных видов. С помощью молекулярных зондов *S. cerevisiae* было проведено детальное сравнение кариотипов биологических видов *Saccharomyces*: *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. arboricola* (Naumov et al., 1992; Naumova et al., 2005; Fisher et al., 2000; Наумова и др., 2011). Саузерн-гибридизация подтвердила большое сходство кариотипов видов *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* и *S. paradoxus*. Порядок и размеры всех 16 гомеологичных хромосом у этих видов одинаковые. Остальные три вида *Saccharomyces* имеют неколлинеарные кариотипы. У *S. cariocanus* обнаружены четыре реципрокные транслокации, затрагивающие хромосомы: IX/XV, II/XVI, XI/IV и XII/XIV. У штаммов *S. mikatae* обнаружена реципрокная транслокация между хромосомами VI и VII. Для типовой культуры *S. mikatae* NBRC1815 характерна дополнительная транслокация, затрагивающая хромосому XVI (Наумова и др., 2011; Fischer et al., 2000). Три реципрокные транслокации выявлены у *S. bayanus*: между хромосомами XV и VIII, IV и II, X и VI. Последняя реципрокная транслокация характерна только для *S. bayanus* var. *ivarum*. Молекулярное кариотипирование дрожжей *S. arboricola* и последующее секвенирование его генома выявили одну реципрокную транслокацию, затрагивающую хромосомы IV и XIII (Wang, Bai, 2008; Liti et al., 2013). Следует отметить, что молекулярное кариотипирование недавно описанного вида *S. jurei* не проводилось.

В работе Pérez-Ortín et al. (2002) была показана роль хромосомных перестроек в адаптивной эволюции дрожжей *S. cerevisiae*. Винные штаммы обладают выраженным полиморфизмом длин хромосомных полос, который чаще всего связан с мобильными Ту-элементами или повторяющимися субтеломерными последовательностями. Интересно отметить, что устойчивость винных дрожжей к сульфиту обусловлена реципрокной транслокацией между хромосомами VIII и XVI. Эта транслокация затрагивает промоторную область гена устойчивости к сульфиту (*SSU1*). Показано, что появление рекомбинантного промотора у винных штаммов

приводит к повышению транскрипции последовательности *SSU1* и, как следствие, к гиперрезистентности к сульфиту – антиоксиданту и антимикробному агенту, широко используемому в виноделии (Goto-Yamamoto et al., 1998; Pérez-Ortín et al., 2002). Более протяженная транслокационная хромосома VIII несет также металлотиионовый ген *CUP1*, отвечающий за устойчивость штаммов к меди (Brenes-Pomales et al., 1955; Puig et al., 2000; Наумов и др., 2013). Таким образом, селекция дрожжей на резистентность к сульфиту приводит к отбору реципрокных транслокаций между хромосомами XVI и VIII, затрагивающих также ген *CUP1* (Наумов и др., 2013).

Известны хромосомные транслокации, затрагивающие ген ферментации сахарозы *SUC2* у дрожжей *S. cerevisiae*. У природных штаммов обнаружены транслокации с участием хромосомы IX (≈ 460 т.п.н.). У гибридов при скрещивании штаммов, обладающих различными транслокациями, за счёт кроссинговера происходило обратное перемещение гена *SUC2* (Наумов, Наумова, 2011).

Повышение резистентности к сульфитам и меди может происходить за счёт увеличения пloidности, или увеличения копий отдельных хромосом (Whittaker et al., 1988). Одним из основных факторов стресса для дрожжей в условиях брожения является этанол. Дрожжи *S. cerevisiae* являются наиболее толерантным видом рода *Saccharomyces*, но существуют штаммовые различия в толерантности к этанолу. Сравнительный анализ геномов пяти штаммов с различной переносимостью этанола, показал, что для высокоэтанолотолерантных дрожжей характерно наличие нескольких копий хромосомы III (Morard et al., 2019). Удаление дополнительной копии хромосомы III, сильно снижало толерантность к этанолу. Показано, что некоторые природные штаммы также имеют дополнительные копии хромосомы III, повышающие их устойчивость к этанолу. Изменение числа копий отдельных хромосом в геномах промышленных дрожжей является

одним из ключевых факторов их адаптации в условиях промышленных ферментаций (Morard et al., 2019; Gorter de Vries et al., 2017).

1.5.3. Межвидовые гибриды *Saccharomyces*

Благодаря наличию общей системы типов спаривания биологические виды *Saccharomyces* могут скрещиваться во всех комбинациях и в симпатрических популяциях в природных и промышленных условиях образовывать межвидовые гибриды. Наиболее известным гибридом являются пивные дрожжи низового брожения *S. pastorianus*, представляющие собой межвидовой гибриды *S. cerevisiae* и криофильных дрожжей *S. bayanus*. По-видимому, межвидовая гибридизация является ответом на селективное воздействие низких температур пивоварения (Dunn, Sherlock, 2008; Belloch et al., 2009). Естественные межвидовые гибриды *S. cerevisiae* × *S. bayanus* var. *ivarum* и *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii* обнаружены в виноделии, а также среди пекарских и пивных дрожжей (Bradbury et al., 2006; Gonzales et al., 2006; Gonzales et al., 2008). Среди винных и сидровых штаммов обнаружены тройные гибриды: *S. cerevisiae* × *S. bayanus* × *S. kudriavzevii* (Naumova et al., 2005; Gonzales et al., 2006; Sipiczki, 2008). Первоначально гибриды *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii* были обнаружены в виноделии, а позднее и в пивоварении (Bradbury et al., 2006; Gonzales et al., 2006). Показано, что некоторые пивоваренные гибриды имеют общее происхождение с винными гибридами (Gonzales et al., 2008). Согласно Belloch et al. (2009), межвидовая гибридизация, по-видимому, произошла в Европе. У гибридов имеется больше сходства с португальскими штаммами *S. kudriavzevii*, чем с японскими. После гибридизации гибридный геном подвергся обширным перестройкам (потеря отдельных хромосом, образование химерных хромосом и другие), затрагивающим участки, в которых расположены гены устойчивости к осмотическому стрессу, температуре брожения, повышенному уровню этанола и другие. В результате этих селективных процессов у изученных природных гибридов *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii*,

наблюдалась тенденция к сохранению большей доли генома *S. cerevisiae* и уменьшению доли *S. kudriavzevii* (Gonzales et al., 2008; Belloch et al., 2009).

Помимо естественных межвидовых гибридов в виноделии широко используются искусственно полученные гибриды для улучшения органолептических и химических показателей вина. Большинство искусственно полученных межвидовых гибридов получено от скрещивания культурных дрожжей *S. cerevisiae* и *S. bayanus* (Наумова и др., 1993; Masneuf et al., 1998, 2002). Промышленные штаммы, полученные в результате таких скрещиваний, имеют адаптивные преимущества и обладают комплексом ценных технологических качеств. Чаще такие гибриды используются в производстве сладких белых вин или шампанского (Наумова и др., 1993).

В последнее десятилетие для межвидовой гибридизации привлекаются также штаммы других видов *Saccharomyces*, не используемых ранее в промышленных ферментациях. Для искусственно полученных межвидовых гибридов винных штаммов *S. cerevisiae* с не ассоциированным с виноделием видом *S. paradoxus* было характерно придание винам более сложного вкуса. Гибриды часто обладают винными свойствами родительских штаммов в новых комбинациях, поэтому межвидовая гибридизация имеет большой потенциал в генетическом улучшении винных дрожжей (Sipiczki, 2008). Так, Bellon et al. (2013) получили гибридный винный штамм между коммерческими винными дрожжами *S. cerevisiae* и природными изолятами *S. mikatae*. По химическим показателям и органолептике гибрид превосходил родительские штаммы. От винных родительских штаммов *S. cerevisiae* гибриды унаследовали устойчивость к повышенным температурам, а также необходимые для брожения вина свойства: способность расти на субстратах с высоким содержанием сахара и толерантность к высокому содержанию этанола. В то же время от *S. mikatae* была унаследована устойчивость к пониженным температурам. За счёт эффекта гетерозиса гибриды были более устойчивы к этанолу, а также обладали повышенной осмоотолерантностью,

что позволяет им размножаться при повышенных концентрациях сахаров (Bellon et al., 2013; Sipiczki, 2019).

В исследовании Nikulin et al. (2018) было показано, что искусственно полученные гибриды *S. cerevisiae* × *S. arboricola* и *S. cerevisiae* × *S. mikatae*, по большинству показателей не уступают традиционно используемым в пивоварении гибридам *S. cerevisiae* × *S. eubayanus*. Межвидовые гибриды показали лучшие результаты, чем родительские штаммы, при приготовлении светлого пива. Для них было характерно большее производство высших спиртов и сложных эфиров, приведшее к получению более ароматного пива. Использование гибридов *S. cerevisiae* × *S. mikatae* позволяет получать безалкогольное пиво с пониженным содержанием высших спиртов по сравнению с эфирами, а также с повышенным содержанием органических кислот без образования повышенного количества уксусной кислоты. Такое пиво имеет нейтральный ароматический профиль без каких-либо отрицательных привкусов (Vašítk et al., 2023). Способность *S. jurei* наравне с мальтозой усваивать и мальтотриозу делает эти дрожжи потенциально применимыми для пивоварения при определённых условиях как самостоятельного пивоваренного штамма (Hutzler et al., 2021). Более сложный вкусовой профиль был у пива, полученного при использовании межвидового гибрида *S. cerevisiae* и *S. jurei* (Giannakou et al., 2021). Для пива, полученного при использовании данных гибридов, были характерны тропические и цветочные тона в аромате. Способность обоих родителей эффективно ферментировать мальтозу и мальтотриозу обеспечивает полное выбраживание сахаров сусла. Для гибридов, полученных при скрещивании *S. cerevisiae* с природными штаммами других видов часто характерна выработка 4-винилгваякола, придающего дымные и гвоздичные тона, нежелательные для пивоварения. Потеря этой способности является признаком одомашнивания дрожжей. У полученных гибридов данный признак может быть устранен путём отбора спорных клонов (Giannakou et al., 2021).

ГЛАВА 2. СУБТЕЛОМЕРНЫЕ ГЕНЫ ФЕРМЕНТАЦИИ САХАРОВ

2.1. Теломеры дрожжей *Saccharomyces*

Концевые участки хромосом дрожжей *S. cerevisiae* состоят из ряда повторяющихся последовательностей, включая открытые рамки считывания, или ORF, и некодирующие последовательности (рис. 3). Собственно теломеры дрожжей *S. cerevisiae* включают вариабельные повторы $(TG_{1-3})_n$ (Zakian, 1996). Непосредственно следом за этими повторами расположены семейства Y' - и X -элементов, а между ними имеются короткие субтеломерные повторы STR (Subtelomeric Repeat), которые представлены в большинстве хромосомных концов (Louis, Haber, 1992; Louis et al., 1994). В субтеломерных районах хромосом дрожжей расположены различные мультигенные семейства, включая гены ферментации различных сахаров (мальтозы, изомальтозы, мелибиозы, сахарозы и др.), а также гены *PGU*, контролирующие гидролиз пектина (Mortimer et al., 1992).

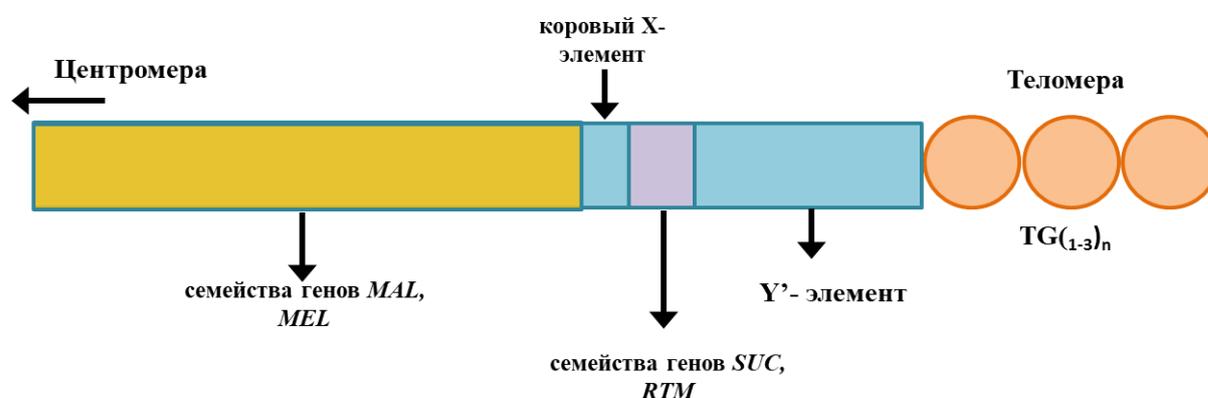


Рисунок 3. Схема строения концевой части хромосома дрожжей *S. cerevisiae* (Louis et al., 1994)

Теломеры играют центральную роль в поддержании целостности генома. Крупномасштабный скрининг коллекций мутантов дрожжей выявил около 500 генов, мутации в которых влияют на длину теломер. Эти гены включают как положительные, так и отрицательные регуляторы длины теломер, а за счёт их взаимодействия достигается баланс в сложном гомеостатическом механизме. Одним из факторов изменений в этих генах

является воздействие на клетки дрожжей стрессовых условий, таких как высокие температуры, содержание в среде этанола или кофеина. Примечательно, что мутация даже одного из этих генов уже влечёт за собой изменение длины теломеры (Harari et al., 2020).

D'Angiolo et al. (2022) провели анализ длин теломер культурных и природных штаммов *S. cerevisiae* и выявили большие различия. Показано, что природные штаммы *S. cerevisiae* имеют более короткие теломеры, чем культурные. Было установлено, что для природных штаммов характерно наличие мутаций, приводящих к потерям функциональности генов, регулирующих длину теломер, что также характерно и для культурных штаммов, попавших в природные условия обитания (D'Angiolo et al., 2022).

2.2. α -Глюкозидазы: мальтазы и изомальтазы

У дрожжей *S. cerevisiae* существует два типа родственных α -глюкозидаз (семейство GH13, международная классификация CAZy <http://www.cazy.org>). Один тип (мальтаза, К.Ф. 3.2.1.20) отвечает за гидролиз и ферментацию α -1,4-глюкозидов (мальтозы и туранозы), а второй (изомальтаза/ α -метилглюкозидаза, К.Ф. 3.2.1.10) – за гидролиз и ферментацию α -1,6-глюкозидов (α -метилглюкозида и изомальтозы) (Наумов, Наумов, 2012; Deng et al., 2014). Оба фермента имеют также общие субстраты: сахарозу и паранитрофенил- α -D-глюкопиранозид.

Генетика ферментации α -глюкозида мальтозы, важной для производства хлеба, кваса, пива, пищевого и технического спирта, имеет большое фундаментальное и прикладное значение. Так, у эукариотических микроорганизмов опероноподобная структура впервые была обнаружена на примере мальтозных полимерных (множественных) локусов *MAL*, состоящих из одного регуляторного и двух структурных генов: пермеазы мальтозы и α -глюкозидазы (мальтазы) (Needleman et al., 1984; Наумов, Юркевич, 1985). У дрожжей *S. cerevisiae* известно пять полимерных локусов *MAL* разной хромосомной локализации: *MAL1* (правое плечо хромосомы VII-R), *MAL2*

(III-R), *MAL3* (II-R), *MAL4* (XI-R) и *MAL6* (VIII-R) (Charron et al., 1986; Charron et al., 1989; Chow et al., 1989; Mortimer et al., 1992). Мальтаза является внутриклеточным ферментом, поэтому для ее ферментации необходима активная пермеаза мальтозы. Каждый из локусов *MAL* состоит из трех тесно сцепленных генов, кодирующих пермеазу мальтозы (GENE1), α-глюкозидазу/мальтазу (GENE2) и регуляторный ген MAL-активатора (GENE3) (рис. 4).

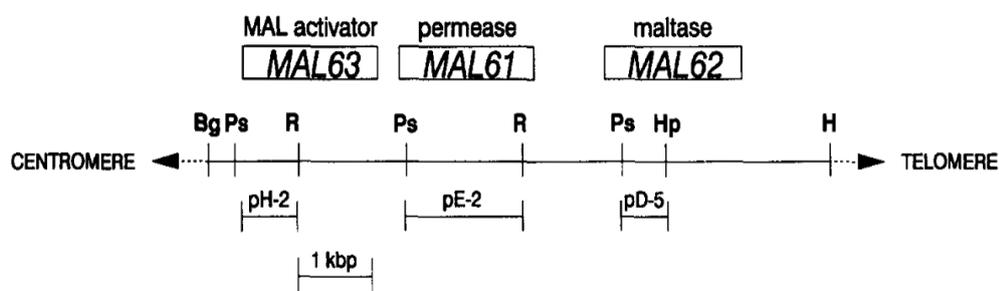


Рисунок 4. Организация локуса *MAL6* дрожжей *Saccharomyces* (Naumov et al., 1994).

В отличие от культурных дрожжей *S. cerevisiae*, обитающие в природе штаммы дрожжей *Saccharomyces* могут ассимилировать только мальтозу, но не сбраживают этот сахар или сбраживают его с большой задержкой. С помощью комплементационного анализа и Саузерн-гибридизации было установлено, что дрожжи *S. paradoxus* обладают только одним локусом *MAL1*, при этом во многих случаях только один из трех генов активен, и поэтому штаммы не способны сбраживать мальтозу (Naumov et al., 1994). По-видимому, в процессе одомашнивания природных штаммов *Saccharomyces* происходило эволюционное развитие признака «ферментации мальтозы» (Наумов, 2013).

Международный проект (Goffeau et al., 1996) по секвенированию и аннотированию генома генетической линии *S. cerevisiae* S288C позволил обнаружить наряду с известными мальтазными генами *MAL12* и *MAL32* новое близкородственное им семейство изомальтазных генов *IMA1–IMA5* (Наумов, Наумов, 2010; Brown et al., 2010; Teste et al., 2010). Уровень идентичности аминокислотных последовательностей известных мальтаз

MAL12, MAL32, MAL62 и изомальтаз IMA1–IMA4 не превышает, соответственно, 99 и 92%, а между собой они имеют 71% идентичных аминокислотных остатков. Изомальтаза IMA5 имеет только 60–66% идентичных аминокислотных остатков с представителями обоих типов α -глюкозидаз.

Биохимический и энзимологический анализ белков IMA1–IMA5 дрожжей *S. cerevisiae*, подтвердил предпочтительное использование в качестве субстрата α -1,6-глюкозидов (α -метилглюкозид и изомальтоза). Помимо α -1,6-глюкозидной активности для этих белков характерна также активность в отношении сахарозы или α -1,3-дисахаридов. Несмотря на высокий уровень сходства последовательностей, существуют различия в активности и термостабильности этих ферментов (Deng et al., 2014).

Обнаружение множественных родственных α -глюкозидаз IMA и MAL позволило изучать их филогенетику. Была определена суммарная копияность этих генов в геномах различных дрожжей: у вида *S. cerevisiae* – 8 копий, у вида *Lachancea (Saccharomyces) kluyveri* – 5 копий, у *Scheffersomyces (Pichia) stipitidis* – 5 копий, у вида *Lachancea (Kluveromyces) thermotolerans* – 4 копии, у *Kluveromyces lactis* – 3 копии, у *Debaryomyces hansenii* – 2, у *Candida albicans* – 2 копии и у вида *Schizosaccharomyces pombe* – всего лишь 1 копия (Brown et al., 2010; Naumoff, 2010; Teste et al., 2010). Установлено, что α -глюкозидазы *L. thermotolerans* (1 копия) и *L. kluyveri* (2 копии) содержат в субстрат специфичном диагностическом сайте трипептид Val216-Gly-Ser (Teste et al., 2010). Последний характерен для изомальтаз, тогда как для мальтаз характерен трипептид Thr-Ala-Gly (Наумов, Наумов, 2010; Yamamoto et al., 2004). Сайт-направленный мутагенез подтвердил важность остатка Val216 для субстратной специфичности дрожжевой изомальтазы (Yamamoto et al., 2004).

Следует отметить, что в литературе имеются только неполные данные об эволюции α -глюкозидаз, депонированных в международных генетических базах (Наумов, Наумов, 2010; Naumoff, 2010; Brown et al., 2010; Teste et al.,

2010). Филогенетическое родство α -глюкозидаз дрожжей *L. thermotolerans* и *L. kluyveri*, филогенетически родственных *S. cerevisiae*, не изучено.

2.3. α -Галактозидазные гены ферментации мелибиозы

При выращивании промышленных штаммов дрожжей-сахаромицетов обычно используют мелассу (отходы сахарного производства), в состав которой входит трисахарид рафиноза. Для полного гидролиза рафинозы дрожжам необходимо наличие двух ферментов – β -фруктозидазы (инвертазы) и α -галактозидазы (мелибиазы) (рис. 5).

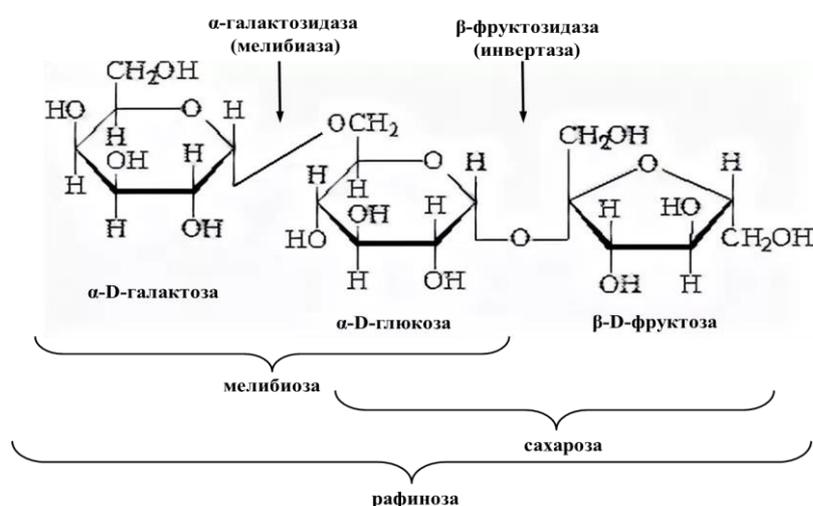


Рисунок 5. Строение молекулы рафинозы и ферменты, необходимые для её полного гидролиза.

α -Галактозидазы (К.Ф.3.2.1.22) имеются у мицелиальных грибов, растений и животных, но довольно редко встречаются у дрожжей. Дрожжи *S. cerevisiae*, как правило, не сбраживают мелибиозу и даже не содержат молчащей последовательности *MEL*, тогда как у штаммов этого вида, обитающих в желудочно-кишечном тракте млекопитающих и отходах производства оливкового масла (альпехин) наблюдается накопление полимерных генов *MEL* (Naumov et al., 1991, 1995, 1996a,b; Turakainen et al., 1993). У штаммов *S. cerevisiae* в разных комбинациях идентифицировано 11 структурных генов *MEL1–MEL11*, расположенных в субтеломерных районах различных хромосом (Naumov et al., 1990; Naumov et al., 1996b).

Признак ферментации мелибиозы характерен для видов *S. arboricola*, *S. bayanus* и *S. mikatae*, а также для гибридных пивных дрожжей низового брожения *S. pastorianus*. Известны единичные изоляты дрожжей *S. paradoxus*, способные ферментировать мелибиозу (Naumova et al. 1996; Наумова и др. 2011). В отличие от культурных дрожжей *S. cerevisiae*, штаммы *S. bayanus*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* имеют только по одной копии гена *MEL*. Филогенетический анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей α -галактозидазных генов выявил видоспецифичность генов *MEL* дрожжей рода *Saccharomyces* (Наумова и др., 2011; Dulermo et al., 2016). Штаммы остальных трех видов (*S. cariocanus*, *S. jurei* и *S. kudriavzevii*), способные утилизировать мелибиозу, не известны. В то же время, в базе данных GenBank имеются нуклеотидные последовательности генов *MEL* у двух штаммов *S. kudriavzevii*: PYCC 5978 и уHKS 300 (Peris et al., 2023).

2.4. β -Фруктозидазные гены *SUC*, контролирующие ферментацию сахарозы

Сахароза – один из распространенных естественных источников углерода для дрожжей *Saccharomyces*. Гидролиз этого дисахарида до глюкозы и фруктозы осуществляется при участии фермента инвертазы, за синтез которого обычно отвечает β -фруктозидазный ген *SUC2* (рис. 5).

В результате транскрипции гена *SUC2* дрожжей *S. cerevisiae* образуются два фермента: внутриклеточная негликозилированная и периплазматическая гликозилированная инвертазы. Последняя необходима для гидролиза сахарозы, в то время как функция внутриклеточного фермента какое-то время была не определена (Carlson, Botstein, 1982). Сравнение каталитических свойств не выявило какой-либо существенной разницы между этими двумя формами одного и того же фермента. Но было отмечено, что внутриклеточная инвертаза имеет лучшую термостабильность, а также стабильность при низких значениях pH.

Экспрессия гена *SUC2* у дрожжей *S. cerevisiae* зависит от регуляторных элементов Rgt1 и Mth1, которые принимают участие в блокировании транскрипции в отсутствие глюкозы (Gancedo et al., 2015). Уровень транскрипции *SUC2* также является ключевым фактором, влияющим на активность инулиназы и способность штаммов *S. cerevisiae* к катаболизму инсулина, активно используемому в производстве биоэтанола. Изменение в последовательности промотора *SUC2* также приводит к различному уровню транскрипта последовательности *SUC2* у разных штаммов *S. cerevisiae* (Yang et al., 2015).

β -Фруктозидазный ген *SUC2* или его нефункциональный аллель имеется у всех изученных штаммов видов *S. cerevisiae*, *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. bayanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* (Carlson, Botstein, 1983; Ness, Aigle, 1995; Naumov et al., 1996; Naumova et al., 2003, 2014). У дрожжей *S. cerevisiae* ген *SUC2* расположен на расстоянии около 14 т.п.н. от субтеломерных последовательностей левого плеча хромосомы IX (Mortimer et al., 1992). У дрожжей *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* гены *SUC* также расположены на хромосоме IX, тогда как у *S. cariocanus* этот ген расположен на хромосоме XV в области реципрокной транслокации (Коршунова и др., 2005). Для пекарских, спиртовых и пивных штаммов *S. cerevisiae* характерно накопление полимерных генов *SUC*, расположенных в субтеломерных районах различных хромосом: *SUC1* (VII), *SUC3* (II), *SUC4* (XIII), *SUC5* (IV), *SUC7* (VIII), *SUC8* (X), *SUC9* (XIV) и *SUC10* (XVI) (Carlson et al., 1985; Ness, Aigle, 1995; Denayrolles et al., 1997; Mortimer et al., 1992; Naumova et al., 2003; Наумов, 2010а,б; Наумова и др., 2014). Инвертазные гены дрожжей недавно описанного нового вида *S. jurei* ранее не изучались.

За устойчивость дрожжей *Saccharomyces* к токсичным веществам, которые содержатся в мелассе, отвечают гены *RTM* (Resistance to Toxic Molasses). Была показана тесная сцепленность этих генов с теломерными генами *SUC*, кодирующими инвертазу (Ness, Aigle, 1995; Naumov et al., 1996;

Denayrolles et al., 1997). Гены *RTM* обнаружены у промышленных штаммов и отсутствуют у лабораторных линий. Скрининг коллекции из 62 винных и пивоваренных дрожжей (*S. cerevisiae* и *S. bayanus*) на наличие генов *RTM*, показал, что только 3 винных и все пивоваренные штаммы содержат последовательности *RTM* в разных количествах копий (Denayrolles et al., 1997; Naumova et al., 2005).

Накопление множественных генов *SUC* в геномах промышленных штаммов *S. cerevisiae*, по-видимому, появляется вследствие селекционного отбора в процессе их доместикации. Штаммы, имеющие полимерные гены *SUC*, имеют селективные преимущества, так как более интенсивно сбраживают сахарозу за счёт суперпродукции инвертазы (Hohmann, 1987).

ГЛАВА 3. СУБТЕЛОМЕРНЫЕ ПЕКТИНАЗНЫЕ ГЕНЫ *PGU*, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ПЕКТИНА

3.1. Пектиновые вещества растений

Пектин – полисахарид растительного происхождения, состоящий из соединенных между собой $\alpha(1-4)$ -гликозидной связью остатков частично метилированной галактуроновой кислоты, прерываемых случайными остатками нейтрального сахара (рамнозы). Являясь структурным элементом растительных тканей, пектин способствует устойчивости растений к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды. В растениях пектиновые вещества чаще всего содержатся в плодах и ягодах в виде растворимого пектина, пектиновой кислоты и протопектина. При созревании плодов протопектин переходит в растворимый пектин под воздействием фермента протопектиназы. Для большинства известных видов плодов растений количество пектиновых веществ колеблется в пределах от 0,3 до 4% (от массы свежего растительного сырья). При этом пектин переходит из одной формы в другую: протопектин превращается в растворимый пектин (Сапожникова, 1965; Кретович, 1986; Jayani et al., 2005; Sakai et al., 1993). Пектины различного происхождения отличаются друг от друга по величине молекулярных масс и степени этерификации карбоксильных групп метиловым спиртом. При степени этерификации равной 50% и более говорят о высокоэтерифицированных пектинах. У низкоэтерифицированных – этот показатель менее 50%. Одним из отличий высокоэтерифицированных от низкоэтерифицированных пектинов является способность последних образовывать студни только в присутствии ионов кальция (Сайфина и др., 2000).

Кожура цитрусовых и яблочные выжимки являются наиболее распространёнными коммерческими источниками для производства пектина. В свежих яблоках содержится порядка 0.5–1.6% пектиновых веществ. У цитрусовых, этот диапазон шире: 12.4–30% от массы высушенной кожуры

(Jayani et al., 2005; Quoc et al., 2015; Bagherian et al., 2011). Пектин из цитрусовых получают кислотной экстракцией и осаждением с использованием спиртов или солей алюминия (May, 1990). Использование этого сырья в качестве исходного для производства пектина имеет ряд трудностей. Важно иметь сырьё высокого качества и в достаточном количестве для экономически эффективного производства. Кроме того, яблочные выжимки и кожура цитрусовых во влажном состоянии являются очень скоропортящимися продуктами, которые активно подвергаются повреждениям плесневыми грибами. Плесени продуцируют широкий спектр пектинолитических ферментов, как деэтерифицирующих (пектинометилэстераза), так и легко разлагающих пектин в сыром материале (полигалактуроназа, пектинолиаза, пектатлиаза). Поэтому нецелесообразно хранить влажные выжимки или кожуру, если они не обработаны специальным образом, более нескольких часов (May, 1990). Жом сахарной свёклы является побочным продуктом сахарной промышленности, чаще всего его используют как корм для жвачных животных. Полисахариды жома сахарной свёклы содержат примерно 22–24% целлюлозы, 30% гемицеллюлозы, 15–25% пектина, 3% золы и 5,9% лигнина. Высокое содержание пектиновых веществ в жоме делает его подходящим сырьем для получения пектина (Sun, Hughes, 1999; Babbar et al., 2016). В исследовании Müller-Maatsch et al. (2016) было показано большое структурное разнообразие и различные физико-химические свойства пектинов, полученных из отходов растениеводческой промышленности.

Высококачественный пектин получают и из необычных источников: травы амаранта и коры хвойных деревьев. Пектин из деревьев хвойных пород характеризуется низкой степенью этерификации (46–48%), что несколько ограничивает его применение в кондитерской промышленности (Ушанова и др., 2008). Амарантовый пектин имеет высокую степень этерификации –71–86%, что сопоставимо с показателями характерными для пектина, полученного из цитрусовых (79.8%) (Сайфина и др., 2000).

Анализ состава клеточной стенки ягод винограда показал, что она состоит примерно на 90% из полисахаридов и менее чем на 10% из белка. Белковый компонент стенок богат остатками аргинина и гидроксипролина. Целлюлоза и полигалактуронаны являются основными составляющими, и на долю каждого из них приходится 30–40% по массе полисахаридного компонента стенок. Содержание этих двух полисахаридов зависит от сортовых различий винограда. Ксилоглюканы составляют примерно 10% полисахаридной фракции, а остальная часть состоит из меньших количеств маннанов, гетероксианов, арабианов и галактанов (Nunan et al., 1997). Vidal et al. (2001) показали, что мякоть ягод винограда содержит пектиновых веществ в два раза больше, чем кожица. Общее содержание пектиновых веществ в ягодах винограда, в зависимости от сорта составляет от 0,5 до 5 г/л. Следует отметить, что процентное соотношение веществ, содержащихся в клеточной стенке винограда, также зависит от степени зрелости ягод (Van Rensburg, Pretorius, 2000; Moore et al., 2014; Fasoli et al., 2016).

3.2. Общая характеристика пектиназ

В процессе расщепления растительных пектиновых веществ участвует несколько ферментов: пектиназы (полигалактуроназы КФ 3.2.1.15), пектин-лиазы (КФ 4.2.2.10) и пектин-эстеразы (КФ 3.1.1.11). По субстратной специфичности расщепляемых пектинов полигалактуроназы разделяются на три основных типа: эндо-полигалактуроназа (КФ 3.2.1.15), экзо-полигалактуроназа (КФ 3.2.1.67), экзо-поли- α -галактуронозидаза (КФ 3.2.1.82). Полигалактуроназы (пектиназы) действуют на последних стадиях расщепления пектина и являются наиболее важными ферментами его модификации (Markovič, Janeček Š., 2001; Jayani et al., 2005; Yang et al., 2018). Филогенетический анализ полигалактуроназных генов показал их высокую консервативность среди наземных растений и отличие от ортологичных генов водорослей и грибов (Park et al., 2008; 2010).

Эти ферменты играют важную роль в пищевой промышленности при производстве соков из ягод и плодов, экстракции масла и в производстве кофе и чая, где они используются для удаления слизистой оболочки с кофейных зерен и ускорения ферментации чая (Kashyap et al., 2001). Эндополигалактуроназа (КФ 3.2.1.15) является разжижающим ферментом и расщепляет нативный высокоэтерифицированный пектин, является основным компонентом промышленных пектинолитических ферментов. Наибольшее практическое применение эндо-полигалактуроназа получила в виноделии. Известно, что даже незначительное содержание пектиновых веществ в вине может приводить к появлению коллоидных помутнений и засорению фильтров (Van Rensburg, Pretorius, 2000). В виноделии для биохимического гидролиза пектиновых соединений используют коммерческие, как правило, неочищенные ферментные препараты грибов *Aspergillus* и *Trichoderma*, в которых, помимо эндо-полигалактуроназы, могут присутствовать примеси и ферменты с нежелательной побочной активностью, например, пектин-эстеразой, приводящей к повышенному содержанию метанола в вине (Louw et al., 2006). Поскольку дрожжи, как правило, не секретируют пектинэстеразу, то их пектиназы безопасны для осветления фруктовых соков и вина (Fernández-González et al., 2004; da Silva et al., 2005). В этой связи, целесообразно в качестве стартовых культур в виноделии использовать штаммы дрожжей-сахаромицетов, обладающих высокой пектинолитической активностью. Blanco et al. (1999) продемонстрировали, что использование штаммов *S. cerevisiae* с эндо-полигалактуроназной активностью способствует эффективному осветлению вина и в два раза сокращает время его фильтрации.

3.3. Эндо-полигалактуроназы дрожжей видов *Saccharomyces*

3.3.1. Вид *Saccharomyces cerevisiae*

Традиционно в виноделии используют дрожжи *S. cerevisiae*, для которых не характерна пектинолитическая активность (Divol, Rensburg, 2007; Fernández-González et al., 2004; Louw et al., 2010). Большинство изученных штаммов этого вида не способны расщеплять пектин, или обладают очень слабой пектинолитической активностью. С помощью полимеразной цепной реакции и Саузерн-гибридизации был проведен скрининг гена *PGU1* у 60 испанских штаммов *S. cerevisiae* винного происхождения: 51 штамм обладал этим геном, а у 9 он отсутствовал (Fernández-González et al., 2004). Отсутствие пектинолитической активности у дрожжей *S. cerevisiae* может быть связано с мутациями в кодирующем эндо-полигалактуроназу структурном гене *PGU1* (псевдоген), его полным отсутствием или с мутациями в регуляторных генах (Divol, Rensburg, 2007; Louw et al., 2010). Единственный известный ген *PGU1* дрожжей *S. cerevisiae* расположен на хромосоме X. Дрожжи *S. cerevisiae* являются наиболее распространённым, но не единственным видом дрожжей, используемых в виноделии. Помимо родственного вида *S. bayanus* var. *ivarum*, в процессе ферментации вина принимают участие дрожжи, не относящиеся к *Saccharomyces*. Несмотря на то, что несахаромицетные дрожжи менее эффективны в процессе ферментации виноградного сусла и менее устойчивы к стрессовым условиям виноделия по сравнению с *S. cerevisiae*, некоторые из них обладают необычными характеристиками, которые положительно влияют на качество производимого вина. На начальных этапах формирования вина сбраживание виноградного сусла осуществляется гетерогенным консорциумом обитающих на виноградниках и оборудовании винных заводов дрожжей, среди которых встречаются виды, обладающие пектинолитической активностью: *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia fructicola*, *Kluveromyces marxianus* (Belda et al., 2016; Rollero et al., 2018; Tufariello et al., 2021). Показано, что применение в виноделии комбинированных стартерных культур (*Saccharomyces* в сочетании с несахаромицетными дрожжами) позволяет улучшать качество вина,

положительно влияет на такие параметры вина как содержание алкоголя и кислотность, а также уменьшает риск недобродов (Belda et al., 2017; Berbegal et al., 2020). Использование штаммов *Saccharomyces* в сочетании с пектинолитическими (*Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia* spp., *Kluveromyces marxianus*) и непектинолитическими (*Torulasporea delbrueckii*, *Hanseniasporea* spp., *Lachancea thermotolerans*, *Pichia* spp. и др.) дрожжами в ряде случаев давали лучшие результаты, чем применение коммерческих ферментных препаратов (Belda et al., 2016; Rollero et al., 2018; Tufariello et al., 2021). Однако необходимо тщательно подбирать несакхаромицетные штаммы, чтобы избежать образования посторонних привкусов и ароматов в вине, а также повышенного образования этилацетата и порчи вина. Следует отметить, что несакхаромицетные дрожжи доминируют только на первых этапах спиртового брожения, и при повышении уровня спирта они полностью вытесняются истинно винными дрожжами *Saccharomyces* (Pretorius, 2000).

3.3.2. Вид *Saccharomyces bayanus*

Помимо *S. cerevisiae*, в виноделии используются родственные дрожжи *S. bayanus* var. *ivarum*, среди которых обнаружены штаммы с высокой пектинолитической активностью, например, французский шампанский штамм SCPP (Gainvors et al., 1994; Gognies et al., 1999), идентифицированный гибридологическим и кариотипическим анализами (Naumov et al., 2001). В отличие от штаммов *S. cerevisiae*, имеющих по одному гену *PGU*, дрожжи *S. bayanus* обладают тремя полимерными генами *PGU1b*, *PGU2b* и *PGU3b*, расположенными, соответственно, на хромосомах X, I и XIV (Наумов и др., 2016; Наумова и др., 2019). Сходство нуклеотидной последовательности гена *PGU1b* с генами *PGU2b* и *PGU3b* составляет соответственно 86% и 87%. Между собой гены *PGU2b* и *PGU3b* дрожжей *S. bayanus* идентичны на 96%. С эндо-полигалактуроназным геном дрожжей *S. cerevisiae* S288C (*PGU1*) ген *PGU1b* имеет 80% сходства. Известно о наличии четырех полимерных генов

PGU у шампанского штамма SCPP. Ген *PGU4b* этого штамма на 99.4% идентичен гену *PGU1 S. cerevisiae* (Наумова и др., 2019). Следует отметить, что пектинолитическая активность дрожжей *S. bayanus* была изучена на ограниченном количестве штаммов.

3.3.3. Вид *Saccharomyces paradoxus*

Ранее дрожжи *S. paradoxus* не изучались по пектинолитической активности. В литературе имеются сведения только по одному штамму RO88, выделенному из виноградников в Хорватии и обладающему высокой пектинолитической активностью (Eschstruth, Divol, 2011). Позднее этот штамм был использован для получения гибрида с винными дрожжами *S. cerevisiae*. Полученные гибриды были способны продуцировать активную эндо-полигалактуроназу в той же степени, что и родительский штамм *S. paradoxus* RO88 (Zietsman et al., 2022). Ничего не известно о пектинолитической активности остальных видов рода *Saccharomyces*: *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. jurei* и *S. mikatae*. Эти дрожжи выделяются из различных природных источников в разных регионах мира. Интересно отметить, что многие коммерческие штаммы, используемые в виноделии Франции, Испании, Австрии, Швейцарии и Австралии, являются межвидовыми гибридами с участием дрожжей *S. kudriavzevii*: гибриды *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii* и *S. cerevisiae* × *S. bayanus* × *S. kudriavzevii* (Naumova et al., 2005; Pérez-Torrado et al., 2018). Пектиназные гены дрожжей *S. paradoxus* и других видов *Saccharomyces* изучались на ограниченном количестве штаммов (Наумов и др., 2016; Наумова и др., 2019). Наибольшее сходство нуклеотидных последовательностей генов *PGU* обнаружено у дрожжей *S. paradoxus PGUp* и *S. cariocanus PGUc* (96.8%), а также *S. mikatae PGUm* и *S. jurei PGUj* (92%). Для генов *PGU* остальных видов *Saccharomyces* сходство было ниже 90% (Наумов и др., 2016; Наумова и др., 2019).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава 4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

4.1. Объекты исследования

Штаммы дрожжей, изученные в работе, включая типовые культуры видов *Saccharomyces*, приведены в Приложении (Таблицы П1–П5). Всего было изучено 575 штаммов, включая: *S. arboricola* – 4, *S. cerevisiae* – 306, *S. bayanus* – 100, *S. cariocanus* – 2, *S. paradoxus* – 129, *S. kudriavzevii* – 17, *S. mikatae* – 14, *S. jurei* – 3.

4.2. Микробиологические методы

4.2.1. Среды для культивирования и споруляции

Дрожжи культивировали на полной агаризованной среде YPD (Yeast extract, Peptone, Dextrose – дрожжевой экстракт, пептон, D-глюкоза) следующего состава (г/л): бакто-агар – 20, глюкоза – 20, дрожжевой экстракт – 10, пептон – 20. Состав жидкой YPD-среды такой же, только без добавления агара. Для индуцирования спорообразования использовали ацетатную среду (г/л): CH_3COONa – 10, KCl – 5, бакто-агар – 20. Для отбора гибридов использовали минимальную селективную среду (г/л): глюкоза – 20, дрожжевая азотная основа без аминокислот – 6, бакто-агар – 20. Если в качестве контрольного маркера одного из родителей использовали неспособность утилизировать мелибиозу (генотип *mel*), то отбор гибридов проводили на минимальной среде с мелибиозой. На всех средах дрожжи культивировали при 28°C. Способность дрожжей сбраживать мелибиозу определяли по выделению углекислого газа в жидкой среде YP в бродильных пробирках с поплавками. Состав ферментационной среды YP тот же, что и среды YPD, но без агара, а вместо глюкозы использовали, соответственно, 2% мелибиозу.

4.2.2. Определение пектинолитической активности

Скрининг на наличие пектинолитической активности осуществляли согласно Louw et al. (2010) в нашей модификации. Дрожжи культивировали в течение 1 суток на твердой YPD среде. Суточные культуры дрожжей уколочной петлей высевали на среду с полигалактуроновой кислотой (PG) следующего состава (г/л): дрожжевая азотная основа (“Difco”, США) – 6.7, полигалактуроновая кислота (“Sigma”, США) – 12.5, глюкоза – 10, Na₂HPO₄ (MW 141.96) – 6.8, агар (“Difco”, США) – 20. Культивировали при 28°C в течение 3 суток, затем выросшие колонии дрожжей смывали дистиллированной водой и визуализацию производили 6М раствором HCl. Ферментативную активность определяли по четким зонам гидролиза (ореолам) полигалактуроновой кислоты вокруг колоний дрожжей. Чашки Петри фотографировали и определяли размер ореолов с помощью ПО IC Measure_2.0.0.272 (www.helicon.ru). Для каждого штамма были проведены два независимых эксперимента. Размер ореолов указывал на способность различных штаммов разлагать полигалактуроновую кислоту. В качестве контроля использовали запатентованный штамм *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718, обладающий высокой пектинолитической активностью. Этот штамм является экспериментально полученным полиплоидом винного штамма Кокур-3 (Патент SU 1495368).

4.3. Молекулярные методы

4.3.1. ПЦР-анализ

Аmplификацию последовательностей рибосомных, ядерных и митохондриальных генов проводили с предварительным выделением ДНК или непосредственно на дрожжевых клетках.

Выделение геномной ДНК проводили по методу, описанному Lboke et al. (2011). Для этого дрожжи культивировали при 28°C на твердой полной питательной среде (YPD) в течение двух суток. Клетки дрожжей

суспендировали в 100 мкл лизирующего LiOAc-SDS буфера (200 мМ LiOAc, 1% SDS) и инкубировали при 70°C в течение 15 минут. Затем в пробирки добавляли по 300 мкл 96% этанола, встряхивали и центрифугировали при 14000 об./мин. в течение 3 минут. После удаления супернатанта повторно промывали осадок, добавив 500 мкл 70% этилового спирта. Осадок оставляли подсыхать на воздухе в течение 50 минут. К осадку добавляли 100 мкл TE буфера (10 мМ трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8.0). ДНК хранили при -20°C.

Полимеразную цепную реакцию осуществляли на ДНК-амплификаторе “Bio-Rad” (США). Для амплификации использовали праймеры, представленные в таблице 1. ПЦР проводили в 30 мкл буфера, содержащего 2.5 мМ MgCl₂, 0.1 мМ каждого dNTP, 50 пмоль каждого праймера, 2.5 единицы *Taq*-полимеразы (“Синтол”, Россия), 20–200 нг ДНК.

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Праймер	Последовательность (5'-3')	Ген или район амплификации
1	2	3
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	5.8S-ITS
ITS2	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
NTS2	AACGGTGCTTTCTGGTAG	IGS2 рДНК
ETS1	TGTCTTCAACTGCTTT	
M3490	TCAGTGTAGCGCGCGTGCGG	18S рДНК
M3989	CTACGGAAACCTTGTTACGACT	
P108	ACCTGGTTGATCCTGCCAGT	18S рДНК
P1190	CAATTGGAGGGCAAGTCTGG	
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	D1/D2 26S рДНК
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	
ATP91	GCAATTAGTATTAGCAGCTAAATATATTGG	<i>ATP9</i>
ATP92	AATAAGAATGAAACCATTAACAGA	
ADE11	CGCTGGTACGTTGCTGTTT	<i>ADE1</i>
ADE12	CGTTAGTGAGACCATTTAGACCC	
ACT13	AGATCCACATTTGTTGGAAGG	<i>ACT1</i>
ACT15	TATCGTCGGTAGACCAAGACA	
SD1	ATGCTTTTGCAAGCTTTC	<i>SUC2</i>
SR	GGTCATGTTACAGATCC	
SUC26	AGATCAACCCATTGCTATCGC	<i>SUC2</i>
SUC27	CCTTCCAAATCTTATTGGGTC	
TRP51	TGGTCACATTTATGACCGCA	<i>TRP5</i>
TRP52	CAAGGACTCTTTTGAAGGC	

PGU11	CACATTGATGGACAAACGCA	<i>PGU</i>
PGU12	AGGATTAACAGCTTGCACCA	<i>S. cerevisiae</i>
PGU13	CCACCAAACGCAATGATTT	<i>PGU1b</i>
PGU14	ATGATGCACCTGAGCCAGAT	<i>S. bayanus</i>
PGU15	GGCAAACGCGATGGTTTTTA	<i>PGU1m/PGU2m</i>
PGU16	AGGTTTAGCATGTTGCACCA	<i>S. mikatae</i>
PGU17	CTTTTGTCAACTTTGTGCGCT	<i>PGU</i>
PGU18	ATGATGCACCTGAGCCAGAT	<i>S. arboricola</i>
PGU21	TTTGTGCGCTTTTGCTGTCG	<i>PGU</i>
PGU23	AAATTGACACCCCGGACCAC	<i>S. paradoxus</i>
PGE11	GCTTTATGCGCTTTTGCTGT	<i>PGU2b</i>
PGE12	AACCAGATGGGATTCCAGAA	<i>S. bayanus</i>
PGB51	TTTTGCTGTCTCAGCAGCTC	<i>PGU3b</i>
PGB52	TTCCAGAACAGCCAGAAAAGG	<i>S. bayanus</i>
FSY11	GGATCYTCRACAAGCGTTTCTC	<i>FSY1</i>
FSY12	AAGGCAAACAYGTAAAGCAAAG	
MET21	CGAAAACGCTCCAAGAGCTGG	<i>MET2</i>
MET22	GACCACGATATGCACCAGGCAG	
HIS31	ATGTCAGAGCAAAAGGCCCTA	<i>HIS3</i>
HIS32	CATGAGAACACCCTTTGTGGA	
COX21	GGTATTTTAGAATTACATGA	<i>COX2</i>
COX22	ATTTATTGTTTCRTTTAATCA	
FUN14D	TATTAAGCTGGGAGTGCCCTT	<i>FUN14</i>
FUN14R	TTATTGGCGTTTAGGCTTGA	
DM1	TTCGCAGATGGGTTGGGACAA	<i>MEL</i>
DM2	TAAGCTTGCTGGAACAGTTGTGTT	

Для амплификации различных участков генома использовали несколько режимов амплификации:

1) рибосомные последовательности (домен D1/D2 26S рРНК, ген 18S рРНК и ITS-участки), ядерные (*ACT1*, *TRP5*) и митохондриальные гены *ADE1* и *ATP9*: начальная денатурация ДНК при 94°C в течение 5 мин; затем 35 циклов в режиме: денатурация при 94°C – 45 с, отжиг праймеров при 52°C – 30 с, синтез ДНК при 72°C – 2 мин; конечная достройка при 72°C – 10 мин;

2) ядерные (*SUC*, *MET2*, *HIS3*, *FSY1*) и митохондриальный (*FUN14*) гены: начальная денатурация ДНК при 94°C в течение 3 мин; затем 30 циклов в режиме: денатурация при 94°C – 30 с, отжиг праймеров при 56°C – 30 с, синтез ДНК при 72°C – 60 с; конечная достройка при 72°C – 10 мин;

3) межгенный спейсер IGS2: начальная денатурация ДНК при 94°C в течение 4 мин; затем 25 циклов в режиме: денатурация при 94°C – 60 с, отжиг праймеров при 48°C – 30 с, синтез ДНК при 72°C – 60 с; конечная достройка при 72°C – 10 мин;

4) ядерные гены *SUC*, *PGU* и *MEL*: начальная денатурация ДНК при 94°C в течение 5 мин; затем 30 циклов в режиме: денатурация при 94°C – 30 с, отжиг праймеров при 56°C – 30 с, синтез ДНК при 72°C – 60 с; конечная достройка при 72°C – 10 мин;

5) митохондриальный ген *COX2*: начальная денатурация ДНК при 94°C в течение 5 мин; затем 45 циклов в режиме: денатурация при 94°C – 40 с, отжиг праймеров при 45°C – 35 с, синтез ДНК при 72°C – 35 с; конечная достройка при 72°C – 10 мин.

Для проведения ПЦР на дрожжевых клетках небольшое количество дрожжевой биомассы суспендировали в 30 мкл буфера, содержащего 3 мМ MgCl₂, 0,3 мМ dNTP, 50 пмоль каждого праймера. Для лизиса клеток полученную смесь выдерживали в режиме денатурации при 95°C в течение 15 минут, затем добавляли *Taq*-полимеразу («Синтол, Россия») и осуществляли амплификацию в соответствии с выбранным режимом на ДНК-аплификаторе «Bio-Rad» (США).

Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле при 60–65 В в 0.5 × TBE буфере (45мМ трис, 10 мМ ЭДТА, 45 мМ борная кислота) в течение 1–1.5 ч. Гель окрашивали в растворе бромистого этидия (5 мкг/мл) в течение 2–3 часов, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция). В качестве молекулярного маркера длин фрагментов ДНК использовали 1 kb DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США).

4.3.2. ПДРФ-анализ ПЦР-амплифицированных IGS2- и 5.8S-ITS-участков рДНК

Рестрикционный анализ IGS2-участков рДНК осуществляли с помощью эндонуклеазы *AluI* (“Fermentas”, Литва). Рестрикцию 5.8S-ITS фрагментов, включающих ген 5.8S рРНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1/ITS2, проводили эндонуклеазами *HpaII*, *HaeIII* и *BglII* (“Fermentas”, Литва). Образцы инкубировали в течение 2–12 часов при 37°C. Разделение фрагментов рестрикции проводили в 2.5%-ном агарозном геле при 50–60В в 0.5 × TBE буфере в течение 2.5 часов. В качестве молекулярного маркера длин фрагментов ДНК использовали препарат 100bp DNA Ladder (“Fermentas”, Литва). Гель окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете, как описано выше.

4.3.3. Секвенирование и филогенетический анализ

Аmplицированные фрагменты элюировали из геля с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) согласно протоколу фирмы-изготовителя. Секвенирование ПЦР-продуктов проводили на обеих цепях по методу Сенгера на автоматическом секвенаторе “Applied Biosystems 3730” (США). Поиск сходства с известными (референсными) нуклеотидными последовательностями проводили с помощью программы BLAST в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Множественные выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit (<https://bioedit.software.informer.com/7.2/>). Филогенетические деревья строили кладистическим методом ближайшего связывания соседей (Neighbor-Joining), разработанным Saitou и Nei (1987), в программе MEGA 10 (Kumar et al., 2018). При объединении соседей в качестве вводных данных используется матрица расстояний, которая определяет расстояние между каждой парой таксонов. Принцип метода заключается в нахождении таких пар Операционных Таксономических Единиц (ОТЕ, соседей), суммарная длина всех ветвей которых была бы минимальной на каждом этапе кластеризации ОТЕ. При отсутствии внешней группы (outgroup), построение деревьев

начинается со звездоподобной топологии (отсутствие кластеров), после чего происходит отделение пары последовательностей от дерева, при котором возникают внутренний и внешний узлы и внутренняя ветвь между ними. Из всех возможных пар последовательностей выбирается та, которая имеет наименьшую сумму длин ветвей. Процедура повторяется до того момента, как будут установлены все внутренние ветви. За корень, в таком случае принимается середина самой длинной ветви дерева. При введении в анализ внешней группы, корнем дерева является узел, в котором внешняя группа присоединяется к основной группе анализируемых последовательностей.

Достоверность полученной топологии филогенетического дерева определяли с помощью бутстреп-анализа, основанного на методе повторных выборок, в программе MEGA 10. Этот метод включает несколько этапов: создание случайных выборок на основе анализируемых последовательностей; получение филогенетических деревьев для каждой случайной выборки (псевдореплика анализируемого дерева); сравнение топологии всех полученных псевдореплик и создание консенсусного дерева. Индексы бутстрепа, определяющие статистическую достоверность каждого из узлов построенного филогенетического дерева подсчитывали для 1000 псевдореплик. Достоверно установленными узлами консенсусного дерева считаются те, для которых статистическая поддержка превышает 70% (Kumar et al., 1994; Лукашов, 2009).

4.3.4. Пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК и Саузерн-гибридизация

Приготовление препаратов хромосомных ДНК описано ранее (Наумова и др., 1993). Дрожжи культивировали в качалке в 15 мл жидкой YPD-среды при 28°C в течение 12–16 часов. Осаждали центрифугированием при 2000 об./мин. в течение 2.5 минут. Осадок дважды промывали раствором ЭДТА/трис (50 мМ ЭДТА, 10 мМ трис, рН 7.5). Далее осадок суспендировали в 200 мкл раствора ЭДТА/трис, содержащего 4 мкг/мл

энзиматического препарата Novozym 234 (Novo Industri A/S, Дания). К полученной суспензии добавляли 800 мкл 1% легкоплавкой охлажденной до 38°C агарозы (Bio-Rad, США). Полученную смесь в течение 40–60 минут выдерживали на льду. Агарозные блоки переносили в пробирки 5 мл и инкубировали в 1 мл буфера LET (0.5 М ЭДТА, 10 мМ трис, pH 7.5) в течение 3 часов на водяной бане при 37°C. Затем инкубировали в течение 8–10 часов при температуре 50°C в NDS-буфере (0.5 М ЭДТА, 10 мМ трис (pH 7.5), 1% N-лаурол-саркозин (pH 9.5) и 2 мг/мл Протеиназы К). После инкубации агарозные блоки промывали 4 раза с интервалом в 1 час в растворе ЭДТА/трис (50 мМ ЭДТА, 10 мМ трис, pH 7.5) и хранили в этом же буфере при 4°C.

Пульс-электрофорез хромосомных ДНК осуществляли на аппарате CHEF-DR III фирмы “Bio-Rad” (США) при 200 В. Для разделения хромосомных полос использовали два режима кариотипирования: 1) 200 В, в течение 15 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 90 с; 2) 200 В, в течение 24 ч при времени переключения полей 15–40 с. В качестве буфера использовали 0.5×TBE, охлажденный до 14°C. Штамм *Saccharomyces cerevisiae* YNN 295 (Bio-Rad), имеющий известный порядок и размеры хромосом, служил кариотипическим стандартом. После электрофореза гель окрашивали бромистым этидием в течение 2–4 часов, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в УФ свете.

Перенос хромосомных ДНК на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли вакуумным методом на аппарате “Vacuum blotter” (“Bio-Rad”, США). Гель последовательно обрабатывали следующими растворами: 1) 0.25 М раствор HCl для депуринизации ДНК в течение 20 мин; 2) денатурирующий раствор (1.5 М NaCl, 0.5 М NaOH) в течение 20 мин; 3) нейтрализующий раствор (1 М трис-HCl, pH 7.5 и 1.5 М NaCl) в течение 20 мин; 4) 20×SSC (3 М NaCl, 0.3 М Na-citrate) для переноса ДНК на мембрану в течение 90 мин.

ДНК фиксировали на мембране отжигом при 80°C в течение 2 ч. В качестве зондов для Саузерн-гибридизации использовали ПЦР-амплифицированные фрагменты генов *ACT1*, *ADE9*, *SUC2*, *TRP5*, *PGU1* (*S. cerevisiae* S288C), *PGU1b* и *MELb* (*S. bayanus* CBS 7001), *PGU1m* (*S. mikatae* NBRC 1815) и *PGU1a* (*S. arboricola* CBS 10644) (таб. 2). Для мечения ДНК применяли нерадиоактивную метку с использованием дигоксигенина (dig-П-dUTP) из набора “DIG High Prime DNA Labeling Detection Starter Kit I” (“Roche”, Швейцария). Гибридизацию проводили согласно протоколу фирмы-изготовителя (“Roche”, Швейцария). Для гибридизации использовали раствор следующего состава: 5×SSC (0.15M NaCl, 0.015 M Na-citrate, pH 7.0), 0.1% N-лауролсаркозин, 0.02% SDS (додецилсульфат натрия), 1% блокирующий реагент, ДНК-метка. Саузерн-гибридизацию проводили в течение 14–16 часов при 68°C в шейкере (Orbital Shaker-Incubator ES-20/60, «BioSan», Латвия). Детекцию гибридизационных сигналов осуществляли в проявляющем растворе (нитросиний тетразолий хлорид, NBT и 5-бром-4-хлор-3-индолил-фосфат, BCIP) в течение 12–16 ч, согласно инструкции фирмы – изготовителя (“Roshe”, Германия).

4.4. Гибридологический анализ

4.4.1. Получение ауксотрофных мутантов

Дрожжи выращивали в течение суток при 28°C на полной среде. Для спорообразования культуру переносили на среду с ацетатом натрия. Экспозиция составляла 2–3 суток при той же температуре.

Сначала были получены высокофертильные моноспоровые культуры изучаемых штаммов, которые затем маркировали ауксотрофными мутациями на селективных средах. Спонтанные ауксотрофные мутации *lys* и *ura* отбирали на селективных средах, содержащих соответственно DL-аминоадипиновую и 5'-фтороротовую кислоты (Boeke, 1984; Sherman et al., 1986). Для получения *lys*-мутантов использовали среду следующего состава

(г/л): дрожжевая азотная основа без $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1.66, глюкоза – 20, лизин – 30(мг/л), бакто-агар – 20. Автоклавировали при 0.8 атм., после чего добавляли очищенный фильтрованием ($0.45\mu\text{m}$) 6% раствор DL-аминоадипиновой кислоты – 34 мл/л. Для получения *ura*-мутантов использовали среду, содержащую (г/л): дрожжевая азотная основа с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 7, глюкоза – 20, урацил – 50(мг/л), бакто-агар – 20, 5'-фтороротовая кислота (5-FOA) – 1. Бакто-агар стерилизовали автоклавированием отдельно в половине объёма дистиллированной воды при 0.8 атм., остальную часть пропускали через фильтр ($0.45\mu\text{m}$).

4.4.2. Получение и анализ гибридов

Дрожжи культивировали и скрещивали при 28°C на твёрдой полной питательной среде YPD. Для индуцирования спорообразования дрожжи переносили на ацетатную среду и экспонировали в течение 2–3 суток при 28°C .

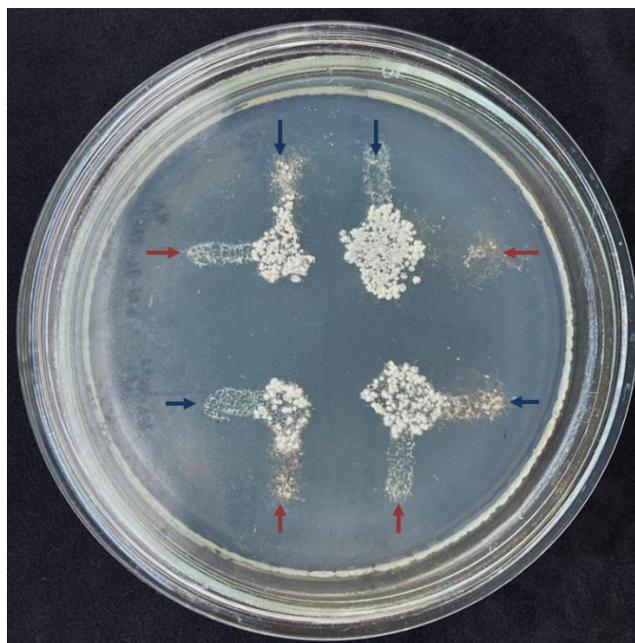


Рисунок 6. Схема гибридизации массовым скрещиванием спор на полной среде с последующим отбором гибридов на минимальной среде. На рисунке приведен отбор на минимальной среде.

Гибридизацию проводили двумя способами: (1) методом “спора на спору” с помощью микроманипулятора; (2) массовым скрещиванием ауксотрофных мутантов на полной среде с последующим отбором гибридов

на минимальной селективной среде. Суспензии суточных культур штаммов с комплементарными селективными ауксотрофными маркерами наносили “крест-накрест” с помощью микробиологической петли. Через 1–2 суток инкубирования дрожжи переносили бархатным репликатором на минимальную среду для отбора гибридов. Для моноспоровой культуры штамма NBRC 1948 в качестве контрольного маркера использовали естественную рецессивную мутацию, приведшую к неспособности усваивать мелибиозу. В этом случае гибридизацию проводили на минимальной среде, в составе которой вместо глюкозы использовали мелибиозу. Образование гибридов регистрировали через 2–3 суток на пересечении штрихов (рис. 6). Гибриды клонировали на минимальной среде с мелибиозой для гарантии освобождения от ауксотрофных родительских культур.

Оболочки асков гибридов разрушали ферментативно желудочным соком виноградной улитки *Helix pomatina* по методу Джонстона и Мортимера (Захаров и др., 1984). Время экспозиции с ферментом для каждого штамма подбирали индивидуально. Для разных штаммов время разрушения оболочки аска варьировало от 12 до 30 минут. С помощью микроманипулирования анализировали 19–136 тетрад каждого гибрида. Мейотическое расщепление контрольных родительских маркеров регистрировали на следующих средах: минимальной, минимальной с добавлением лизина или урацила, минимальной с добавлением лизина и урацила. Мейотическое расщепление у гибридов, чей родительский штамм был не способен усваивать мелибиозу, проводили на минимальной среде с использованием вместо глюкозы мелибиозы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 5. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES*: БИОЛОГИЧЕСКИЙ ВИД *S. JUREI*

С помощью ПЦР-ПДРФ-анализа 5.8S-ITS фрагментов, включающих ген 5.8S рРНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1/ITS2, молекулярного кариотипирования и сравнительного анализа ряда ядерных и митохондриальных генов было проведено молекулярно-генетическое изучение дрожжей *Saccharomyces* различной видовой принадлежности, включая недавно описанный новый вид *S. jurei*.

5.1. Определение видовой принадлежности новых штаммов

Сначала с помощью молекулярных методов была проведена реидентификация 13 коллекционных штаммов *Saccharomyces*, полученных из двух коллекций микроорганизмов UCDFST (Phaff Yeast Culture Collection, Department of Food Science and Technology, University of California, Дэвис, США) и ВКМ (Всероссийская Коллекция Микроорганизмов, Пущино, Россия). Эти штаммы были получены под следующими видовыми названиями: *S. cerevisiae* (UCDFST 61-196, UCDFST 61-232, UCDFST 61-351, UCDFST 62-186, UCDFST 67-570, UCDFST 69-1006, UCDFST 72-129), *S. paradoxus* (UCDFST 51-137, UCDFST 52-225, UCDFST 61-220, ВКМ Y-3330) и *S. bayanus* (UCDFST 61-137, UCDFST 73-538.2) (Приложение, Таблицы ПЗ–П5). Штаммы UCDFST выделены из различных природных источников в Северной Америке, за исключением изолированного в Японии штамма UCDFST 67-570. Штамм ВКМ Y-3330 выделен из почвы в Дагестане.

Характерной особенностью дрожжей *S. arboricola*, *S. bayanus* и *S. mikatae* является способность ферментировать мелибиозу, тогда как штаммы видов *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* и *S. jurei* не утилизируют этот сахар. Принимая во внимание, что все 13 анализируемых нами штаммов не росли на минимальной среде с мелибиозой, мы

предположили, что эти штаммы могли относиться к видам *S. cerevisiae*, *S. cariocanus*, *S. paradoxus*, *S. kudriavzevii* и *S. jurei*. С помощью ПДРФ-анализа 5.8S-ITS фрагментов с использованием эндонуклеазы *HpaII* и *HaeIII* можно дифференцировать виды *S. cerevisiae* и *S. kudriavzevii* от *S. paradoxus/S. cariocanus* (Серпова и др., 2011). Последние два вида различаются также и по молекулярным кариотипам (Naumov et al., 2000a). Дрожжи *S. jurei* ранее не изучались с помощью ПДРФ-анализа.

У 13 коллекционных штаммов была проведена амплификация 5.8S-ITS последовательностей. В качестве контролей использовали видовые тестеры: штаммы *S. cerevisiae* S288C, *S. paradoxus* CBS 432, *S. cariocanus* UFRJ 50816, *S. kudriavzevii* NBRC 1802 и *S. jurei* CBS 14759. У всех изученных и контрольных штаммов размер амплифицированных фрагментов был одинаковым и составлял примерно 850 п.н., что характерно для дрожжей рода *Saccharomyces*. Амплифицированные 5.8S-ITS фрагменты анализировали с помощью ферментативного расщепления эндонуклеазами *HaeIII* и *HpaII*. На рис. 7а и 7б представлены *HpaII* и *HaeIII*-профили изученных и контрольных штаммов. Контрольные штаммы *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* и *S. jurei* не имеют *HpaII*-сайтов рестрикции (рис. 7а, дорожки 2–5). ПДРФ-профили штамма-тестера *S. cerevisiae* S288C и штаммов UCDFST 61-137 и UCDFST 61-351 были идентичными и характеризовались двумя *HpaII*-фрагментами размером 730 и 120 п.н. и четырьмя *HaeIII*-фрагментами размером около 320, 230, 170 и 130 п.н. (рис. 7а и 7б, дорожки 1, 15 – 16). Штаммы UCDFST 51-137, UCDFST 52-225, UCDFST 61-196, UCDFST 61-220, UCDFST 61-232, UCDFST 62-186, UCDFST 67-570, UCDFST 69-1006, UCDFST 72-129 и ВКМ Y-3330 по ПДРФ-профилям не отличались от контрольных штаммов *S. paradoxus*, *S. cariocanus* и *S. jurei* (рис. 7а и 7б, дорожки 6–12, 14, 17 и 18). Принимая во внимание, что оба известных штамма *S. cariocanus* выделены в Бразилии, скорее всего 9 UCDFST штаммов и штамм ВКМ Y-3330 относятся к виду *S. paradoxus* или *S. jurei*. У штамма UCDFST 73-538.2 обнаружен

комбинированный профиль, объединяющий фрагменты *S. cerevisiae*-типа и *S. paradoxus/S. jurei*-типа (рис. 7а и 7б, дорожка 13).

С помощью программы NEBcutter мы сравнили рестрикционные карты 5.8S-ITS фрагментов типовых культур *S. jurei* CBS 14759 и остальных 7 видов *Saccharomyces* (рис. 8). В ITS-участке дрожжей *S. jurei* имеется *Bgl*III-сайт рестрикции, который отсутствует у остальных видов *Saccharomyces*, включая *S. paradoxus* (<https://nc3.neb.com/NEBcutter/>). На рис. 9 представлены *Bgl*III-профили типовых культур 8 видов *Saccharomyces*, штамма ВКМ У-3330, девяти изученных штаммов коллекции UCDFST, не имеющих *Hpa*II-сайта рестрикции, а также штамма UCDFST 73-538.2, имеющего гибридный *Hpa*II-профиль. Типовая культура *S. jurei* NCYC 3947 и штамм ВКМ У-3330 имеют два *Bgl*III-фрагмента размером 650 и 200 п.н. (рис. 9, дорожки 9 и 10). Все 12 изученных UCDFST штаммов и контрольные штаммы других видов не имеют *Bgl*III-сайта рестрикции (рис. 9, дорожки 1–8, 11–20).

Таким образом, с помощью эндонуклеаз *Hpa*II и *Bgl*III удалось установить, что штамм UCDFST 73-538.2 является гибридом дрожжей *S. cerevisiae* и *S. paradoxus*. С помощью секвенирования ядерного гена *ACT1* была подтверждена принадлежность штаммов UCDFST 61-137 и UCDFST 61-351 к виду *S. cerevisiae*, а также гибридная природа штамма UCDFST 73-538.2. Большинство штаммов из коллекции UCDFST идентифицированы как *S. paradoxus*: 51-137, 52-225, 61-196, 61-220, 61-232, 62-186, 67-570, 69-1006, 72-129. Согласно ПДРФ-анализу, штамм ВКМ У-3330, выделенный из почвы в Дагестане, относится к *S. jurei*. Следует отметить, что это первый случай обнаружения этого вида на территории России. Всего известно 3 штамма *S. jurei*: два выделены во Франции из коры дуба и один в Германии из коры ясеня (Naseeb et al., 2017; Hutzler et al., 2021).

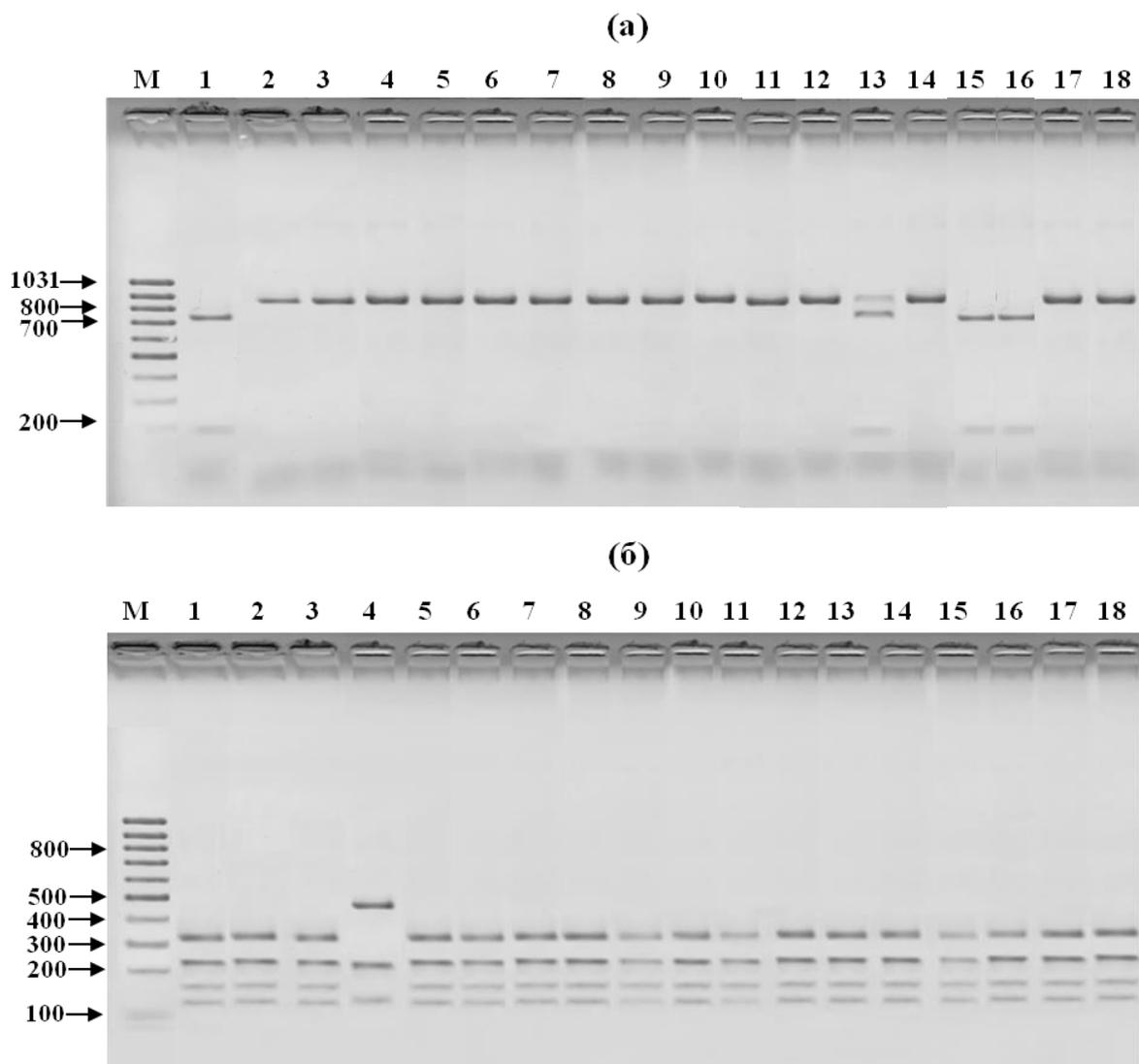


Рисунок 7. Рестрикционный анализ амплифицированных 5.8-ITS-фрагментов рДНК штаммов *Saccharomyces* с помощью эндонуклеаз *Hpa*II (а), *Hae*III (б). Дорожки (а,б): 1 – *S. cerevisiae* S288C, 2 – *S. paradoxus* CBS 432, 3 – *S. cariocanus* UFRJ 50816, 4 – *S. kudriavzevii* NBRC 1802, 5 – *S. jurei* CBS 14759, 6 – UCDFST 51-137, 7 – UCDFST 52-225, 8 – UCDFST 61-196, 9 – UCDFST 61-220, 10 – UCDFST 61-232, 11 – UCDFST 62-186, 12 – UCDFST 67-570, 13 – UCDFST 73-538.2, 14 – UCDFST 72-129, 15 – UCDFST 61-137, 16 – UCDFST 61-351, 17 – UCDFST 69-1006, 18 – ВКМ Y-3330. М – маркер молекулярных весов (п.н.) “100bp DNA Ladder” (“Fermentas”, Литва).

	<i>Bgl</i> III		
<i>S. jurei</i> CBS 14759	CTTTCTTGCTATTCCAAACAGTGAGAGATC	TT-TGTGTTTTTGTATAGGACAATTAAAA	237
<i>S. cerevisiae</i> S288CG.....	..T.C-...C.....	
<i>S. paradoxus</i> CBS 432G.....	..T.C-...C.A.....	
<i>S. cariocanus</i> UFRG 50816G.....	..T.C-...C.A.....	
<i>S. mikatae</i> NBRC 1815G.....	..T.C-...C.....	
<i>S. kudriavzevii</i> NBRC 1802G.....	..T.C-C.....C.....	
<i>S. arboricola</i> CBS 10644G.....	..T.C-C.....A.....	
<i>S. bayanus</i> CBS 7001G.....	..T.C-C.....C.....	

Рисунок 8. Нуклеотидные последовательности 5.8S-ITS-района рДНК типовых культур дрожжей *Saccharomyces*. Идентичные нуклеотидные позиции обозначены точками. Нумерация последовательностей приводится по штамму *S. jurei* CBS 14759. Розовым цветом выделен *Bgl*III-сайт рестрикции.

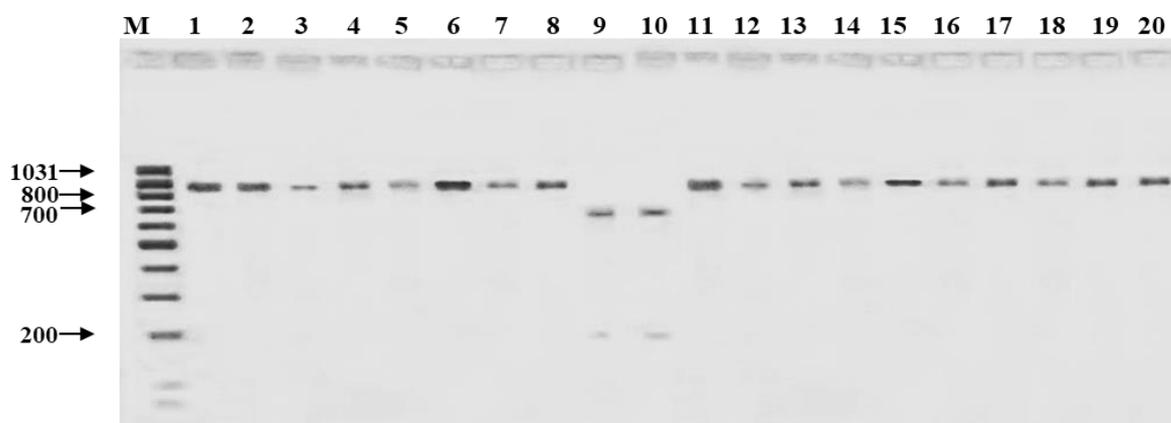


Рисунок 9. Рестриционный анализ амплифицированных 5.8-ITS-фрагментов рДНК штаммов *Saccharomyces* с помощью эндонуклеазы *Bgl*III. Дорожки: 1 – *S. cerevisiae* S288C, 2 – *S. paradoxus* CBS 432, 3 – *S. kudriavzevii* NBRC 1802, 4 – *S. mikatae* NBRC 1815, 5 – *S. cariocanus* UFRJ 50816, 6 – *S. arboricola* CBS 10644, 7 – *S. bayanus* var. *uvarum* CBS 7001, 8 – *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 425, 9 – *S. jurei* CBS 14759, 10 – BKM Y-3330, 11 – UCDFST 51-137, 12 – UCDFST 52-225, 13 – UCDFST 61-196, 14 – UCDFST 61-220, 15 – UCDFST 61-232, 16 – UCDFST 62-186, 17 – UCDFST 67-570, 18 – UCDFST 69-1006, 19 – UCDFST 72-129, 20 – UCDFST 73-538.2. М – маркер молекулярных весов (п.н.) “100bp DNA Ladder” (“Fermentas”, Литва).

5.2. Мультигенный филогенетический анализ

Новый вид *S. jurei* был описан на основании дивергентных нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 гена 26S рРНК и внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) (Naseeb et al., 2017).

Мы провели секвенирование гена 18S рРНК, ядерного гена *ACT1* и митохондриального гена *ATP9* у типовой культуры *S. jurei* CBS 14759, штаммов NCYC 3962 и BKM Y-3330. У последнего штамма также определили нуклеотидные последовательности домена D1/D2 26S рДНК и

ITS-участков. Полученные нуклеотидные последовательности сравнили с соответствующими последовательностями остальных семи видов рода *Saccharomyces*, имеющимися в GenBank. Дрожжи *S. jurei*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae* имеют идентичные нуклеотидные последовательности гена 18S рРНК (рис.10), которые отличаются одной нуклеотидной заменой от пары видов *S. cerevisiae*/*S. paradoxus* и вида *S. bayanus*, соответственно, в позициях 645 и 713 (нумерация приводится по последовательности типовой культуры *S. cerevisiae* CBS 1171). Отличия от *S. cariocanus* и *S. arboricola* составили две нуклеотидные замены (соответственно, позиции 191, 645 и 879, 948).

	18S рРНК				
	191	645	713	879	948
<i>S. cerevisiae</i> CBS 1171 (T)	C	C	A	G	G
<i>S. paradoxus</i> CBS 432 (T)
<i>S. paradoxus</i> CBS 5829
<i>S. cariocanus</i> UFRJ 50816 (T)	(T)
<i>S. cariocanus</i> UFRJ 50791	(T)
<i>S. kudriavzevii</i> NBRC 1802 (T)	.	T	.	.	.
<i>S. kudriavzevii</i> NBRC 1803	.	T	.	.	.
<i>S. mikatae</i> NBRC 1815 (T)	.	T	.	.	.
<i>S. mikatae</i> NBRC 1816	.	T	.	.	.
<i>S. jurei</i> CBS 14759 (T)	.	T	.	.	.
<i>S. jurei</i> NCYC 3962	.	T	.	.	.
<i>S. jurei</i> ВКМ Y-3330	.	T	.	.	.
<i>S. arboricola</i> CBS 10644 (T)	.	T	.	(A)	(T)
<i>S. arboricola</i> AS 2.3318	.	T	.	(A)	(T)
<i>S. bayanus</i> var. <i>bayanus</i> CBS 380 (T)	.	T	(G)	.	.
<i>S. eubayanus</i> CBS 12357 (T)	.	T	(G)	.	.
<i>S. bayanus</i> var. <i>ivarum</i> CBS 7001	.	T	(G)	.	.

Рисунок 10. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена 18S рРНК дрожжей *Saccharomyces*. Нумерация последовательности приводится по типовой культуре *S. cerevisiae* CBS 1171. Овалом выделены нуклеотидные замены, характерные для видов *S. cariocanus*, *S. arboricola* и *S. bayanus*. Т – типовая культура.

Нуклеотидные последовательности ядерного гена *ACT1* и митохондриального гена *ATP9* оказались более вариабельными. Следует отметить, что оба гена высоко консервативны и имеют идентичные аминокислотные последовательности у семи видов рода *Saccharomyces*: *S. cerevisiae*, *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* (Groth et al., 1999; Daniel et al., 2001; Spirek et al., 2003; Naumova et al., 2005; Naumov et al., 2010). При этом нуклеотидные последовательности этих генов у видов *Saccharomyces* отличаются несколькими синонимичными заменами нуклеотидов.

В последовательности гена *ACT1* дрожжей *S. jurei* было обнаружено от 16 до 31 нуклеотидных замен по сравнению с остальными видами *Saccharomyces*. Наиболее сходны гены *ACT1* видов *S. jurei* и *S. mikatae*, тогда как наибольшее количество нуклеотидных замен имеется в *ACT1* гене дрожжей *S. arboricola*. При этом все замены были молчащими, не вызывая изменений в аминокислотной последовательности кодируемого белка. Гены *ATP9* дрожжей *S. jurei* и *S. paradoxus* идентичны и отличаются от генов *ATP9* остальных видов *Saccharomyces* 2–10 молчащими заменами.

Мы также сравнили нуклеотидные последовательности домена D1/D2 26S рДНК и ITS-участка штамма ВКМ Y-3330 и имеющиеся в GenBank соответствующие последовательности дрожжей *S. jurei* и остальных видов *Saccharomyces*. Все три штамма *S. jurei* (CBS 14759, NCYC 3962 и ВКМ Y-3330) имеют идентичные D1/D2 и ITS-последовательности. Различия *S. jurei* по последовательностям домена D1/D2 составили 1–2 нуклеотида с видами *S. paradoxus*, *S. cariocanus* и *S. kudriavzevii*, а также 5–7 нуклеотидов с остальными видами *Saccharomyces* (рис. 11). Сравнительный анализ наиболее вариабельного участка кластера генов рРНК – ITS последовательности – выявил от 6 до 18 нуклеотидных замен.

D1/D2 26S pPHK

	71	102	105	107	108	109	185	186	187	189	192	387	408	420	422	462	463	474	480	485	500	501	515
<i>S. cerevisiae</i> CBS 1171 (T)	C	C	T	G	G	G	T	T	-G	A	G	T	A	C	T	C	A	G	C	T	G	T	G
<i>S. paradoxus</i> CBS 432 (T)	A	.	::	G	A	T	G	.	C	.
<i>S. paradoxus</i> CBS 5829	A	.	::	G	A	T	G	.	C	.
<i>S. paradoxus</i> N9	A	.	::	G	A	T	G	.	C	.
<i>S. paradoxus</i> N12	A	.	::	G	A	T	G	.	C	.
<i>S. paradoxus</i> NBRC1804	A	.	::	G	A	T	G	.	C	.
<i>S. paradoxus</i> 44	A	.	::	G	A	T	G	.	C	.
<i>S. paradoxus</i> 95-1	::	G	A	T	G	.	C	.
<i>S. paradoxus</i> UCDFST 72-149	::	G	A	T	G	.	C	.
<i>S. paradoxus</i> UCDFST 52-153	::	G	A	T	G	.	C	.
<i>S. paradoxus</i> UWO(PS) 91-917	::	G	A	T	G	.	C	.
<i>S. cariocanus</i> UFRJ 50816	::	G	A	T	G	.	C	.
<i>S. cariocanus</i> UFRJ 50791	::	G	A	T	G	.	C	.
<i>S. arboricola</i> CBS 10644 (T)	A	A	C	.	T	.	T	G	A	T	G	.	C	.
<i>S. arboricola</i> AS 2.3318	A	A	C	.	T	.	T	G	A	T	G	.	C	.
<i>S. kudriavzevii</i> NBRC 1802 (T)	A	A	.	.	-T	.	.	C	G	.	.	.	G	A	T	G	.	C	.
<i>S. kudriavzevii</i> NBRC 1803	T	A	A	C	G	A	T	G	.	C	.
<i>S. mikatae</i> NBRC 1815 (T)	T	T	C	A	.	A	C	A	AT	G	A	G	A	T	G	.	C	.
<i>S. mikatae</i> NBRC 1816	T	T	C	A	.	A	C	A	AT	G	A	G	A	T	G	.	C	.
<i>S. bayanus</i> var. <i>bayanus</i> CBS 380 (T)	T	A	A	C	G	.	G	.	G	A	T	G	A	.	A
<i>S. bayanus</i> var. <i>uvarum</i> CBS 7001	T	A	A	C	G	.	G	.	G	A	T	G	A	.	.
<i>S. eubayanus</i> CBS 12357	T	A	A	C	G	.	G	.	G	A	T	G	A	.	A
<i>S. jurei</i> CBS 14759 (T)	T	A	G	A	T	G	.	C	.
<i>S. jurei</i> NCYC 3962	T	A	G	A	T	G	.	C	.
<i>S. jurei</i> BKM Y-3330	T	A	G	A	T	G	.	C	.

Рисунок 11. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 26S рРНК дрожжей *Saccharomyces* (процедура множественных выравниваний). Нумерация последовательности приводится по типовой культуре *S. cerevisiae* CBS 1171. Т – типовая культура.

Для определения генетического родства видов рода *Saccharomyces* был проведен мультигенный филогенетический анализ (рис. 12). В качестве внешней группы использовали типовую культуру *Naumovozyma castellii* CBS 4309.

На филогенетическом древе выделяются четыре кластера. В первый кластер попали три вида: *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. cariocanus* (статистическая поддержка 90%); причем последние два вида наиболее генетически родственны. Виды *S. mikatae* и *S. jurei* сформировали второй кластер с 97%-ной статистической поддержкой. Третий кластер объединяет наиболее отдаленно родственные виды *S. kudriavzevii* и *S. arboricola* (с бутстреп-поддержкой 68%). Отдельный кластер сформировали дрожжи *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *ivarum* и *S. eubayanus* (100% бутстреп-поддержка).

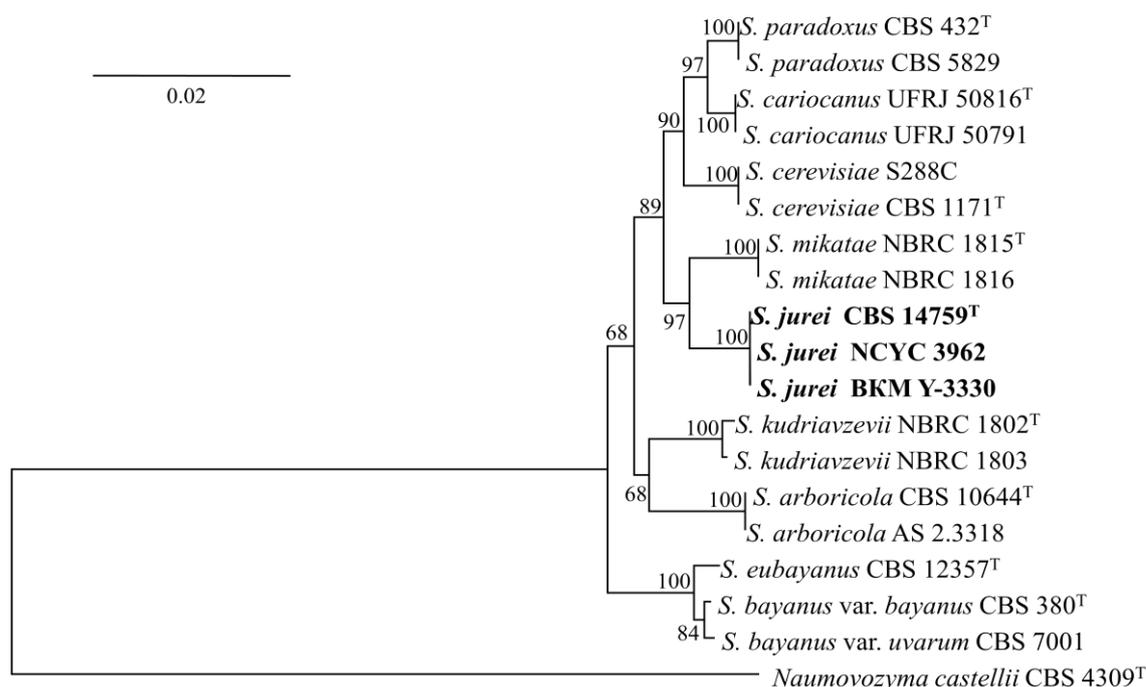


Рисунок 12. Мультигенный филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 18S рРНК, домена D1/D2 гена 26S рРНК, 5.8S-ITS-участка, ядерного гена *ACT1* и митохондриального гена *ATP9* дрожжей рода *Saccharomyces*. В качестве внешней группы использовали типовую культуру *Naumovozyma castellii* CBS 4309. Шкала соответствует 20 нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. Приводятся значения бутстрепа >70%. Т – типовая культура. Жирным шрифтом отмечены штаммы, нуклеотидные последовательности которых определены в данной работе.

Таким образом, сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей ядерных и митохондриальных генов показал, что вид *S. jurei* филогенетически наиболее близок дрожжам *S. mikatae*.

5.3. Молекулярное кариотипирование и Саузерн-гибридизация

Дрожжи *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* имеют одинаковые базовые кариотипические характеристики: гаплоидное число хромосом ($n = 16$) и предельные размеры хромосом от 245 до 2200 т.п.н. (Naumov et al., 1992, 1995a, 1995b, 2000; Naumova et al., 2005; Wang, Bai, 2008). Следует отметить, что молекулярное кариотипирование нового вида *S. jurei* ранее не проводилось. Мы сравнили молекулярные кариотипы дрожжей *S. jurei* и остальных семи видов рода *Saccharomyces* (рис. 13а). Идентификацию отдельных хромосомных полос проводили по кариотипу стандартного штамма *S. cerevisiae* YNN 295 (рис. 13а, дорожка 1).

Кариотипический профиль дрожжей *S. jurei* характеризуется отсутствием двух нижних полос, соответствующих по размерам хромосомам I (245 т.п.н.) и VI (290 т.п.н.) контрольного штамма YNN 295 (рис. 13а, дорожки 17–19 и 1). Хромосома размером около 290 т.п.н. также отсутствует у штаммов *S. bayanus* var. *ivarum* (рис. 13а, дорожки 11 и 12) и *S. mikatae* (рис. 13а, дорожки 15 и 16; рис. 14а, дорожки 5–10). Известно, что у штаммов *S. mikatae* имеется реципрокная транслокация между хромосомами VI и VII, а у типовой культуры NBRC 1815 еще одна дополнительная транслокация, затрагивающая хромосому XVI (Fischer et al., 2000; Наумова и др., 2011). У разновидности дрожжей *S. bayanus* var. *ivarum* одна из реципрокных транслокаций затрагивает хромосомы VI и X (Naumova et al., 2005).

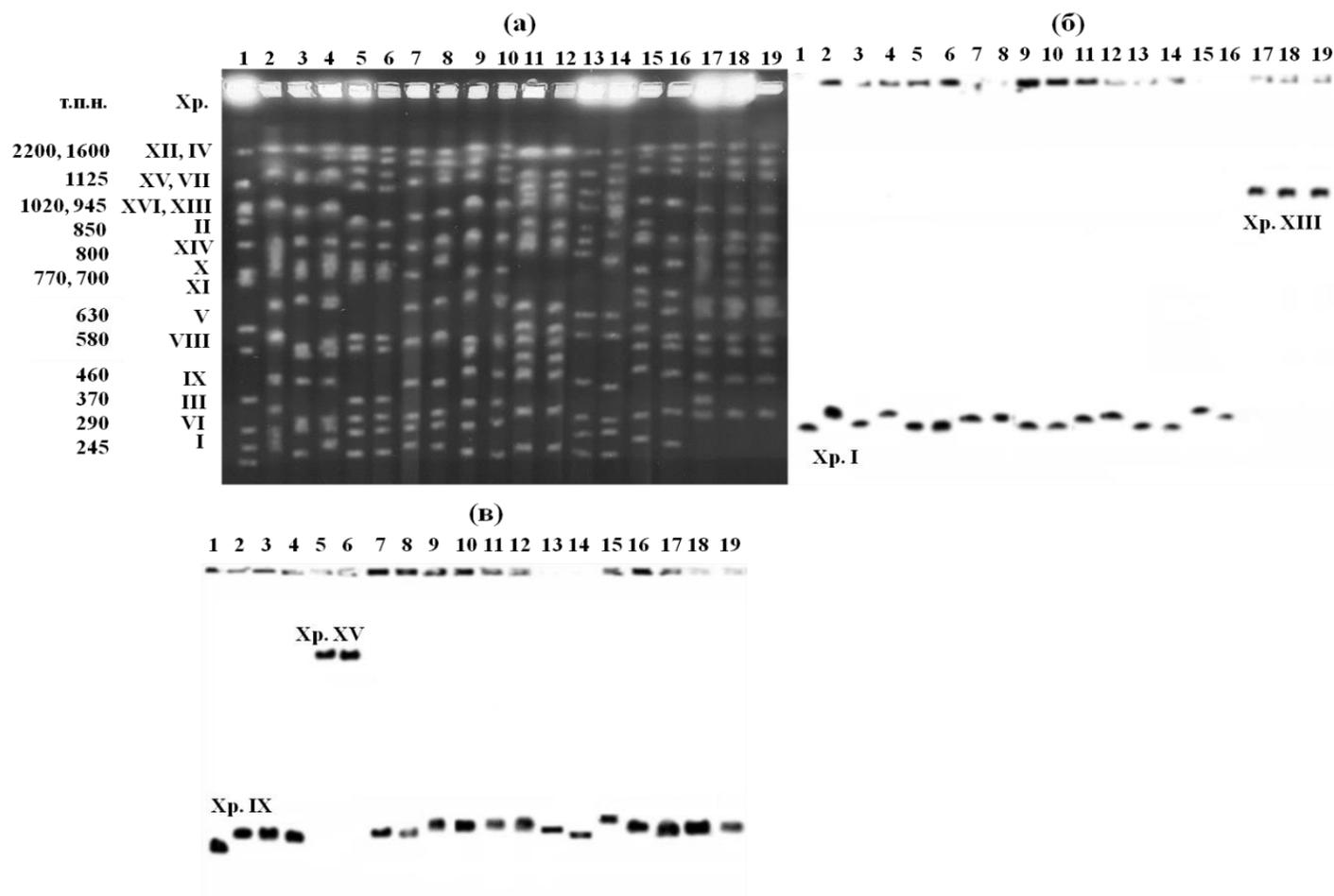


Рисунок 13. Пульс-электрофорез (а) и Саузерн-гибридизация (б, в) хромосомных ДНК дрожжей рода *Saccharomyces* с зондами *ADE1* (б) и *SUC2* (в) *S. cerevisiae*. Дорожки: *S. cerevisiae*: 1 – YNN 295, 2 – S288C; *S. paradoxus*: 3 – CBS 432, 4 – NBRC 1804; *S. cariocanus*: 5 – UFRJ 50791, 6 – UFRJ 50816; *S. arboricola*: 7 – CBS 10644, 8 – AS 2.3318; *S. kudriavzevii*: 9 – NBRC 1802, 10 – NBRC 1803; *S. bayanus* var. *uvarum*: 11 – CBS 7001, 12 – ВКМ Y-1146; *S. bayanus* var. *bayanus*: 13 – CBS 380; *S. eubayanus*: 14 – CBS 12357; *S. mikatae*: 15 – NBRC 1815, 16 – NBRC 1816; *S. jurei*: 17 – NCYC 3947, 18 – NCYC 3962, 19 – ВКМ Y-3330. Нумерация и размеры хромосом приводятся согласно стандартному штамму *S. cerevisiae* YNN 295 (дорожка 1).

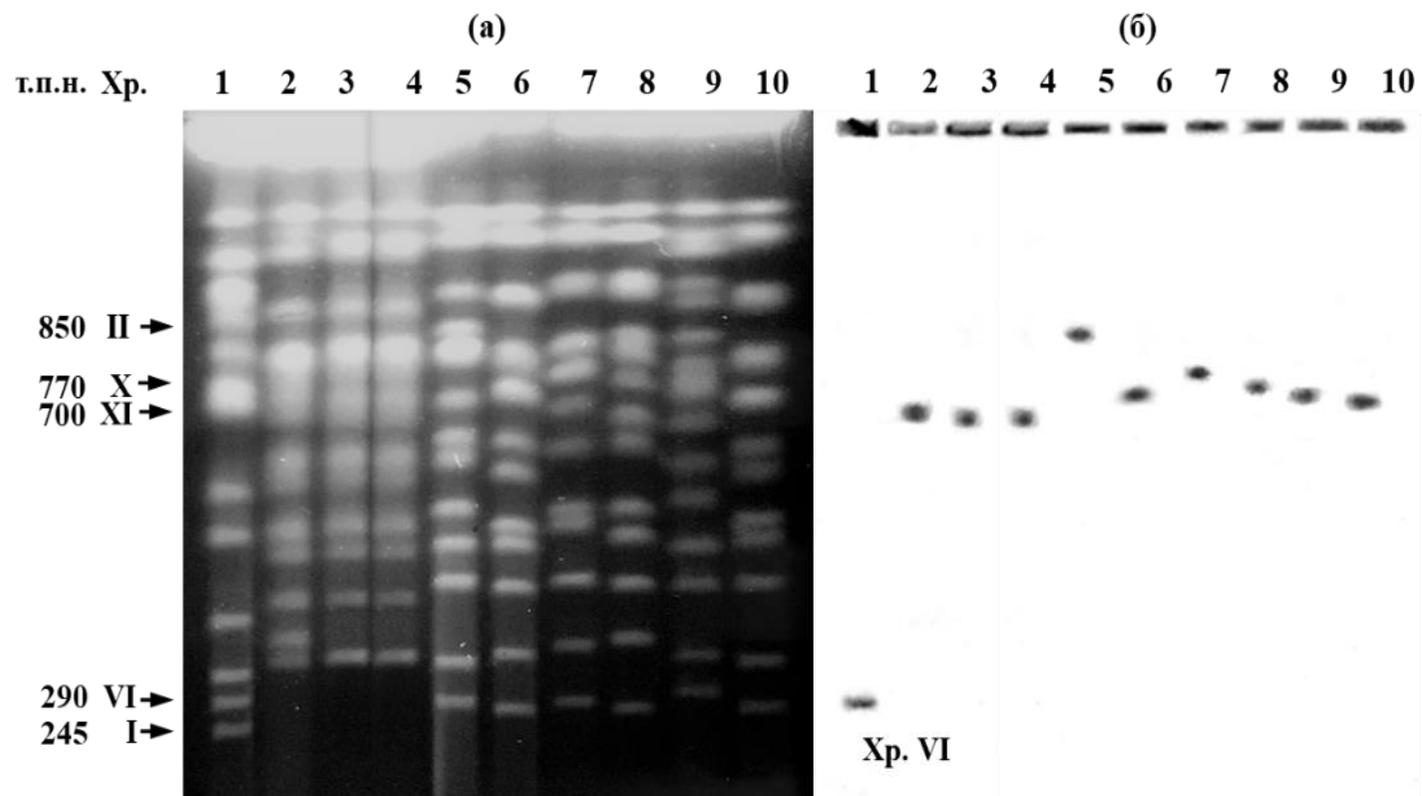


Рисунок 14. Пульс-электрофорез (а) и Саузерн-гибридизация (б) хромосомных ДНК дрожжей *Saccharomyces jurei* и *S. mikatae* с зондом *ACT1 S. cerevisiae*. Дорожки: *S. cerevisiae*: 1 – YNN 295; *S. jurei*: 2 – NCYC 3947, 3 – NCYC 3962, 4 – ВКМ Y-3330; *S. mikatae*: 5 – NBRC 1815, 6 – NBRC 1816, 7 – NBRC 10992, 8 – NBRC 10993, 9 – NBRC 10996, 10 – NBRC 11002. Нумерация и размеры хромосом приводятся согласно стандартному штамму *S. cerevisiae* YNN 295 (дорожка 1).

Указанная транслокация отсутствует у штаммов *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. eubayanus*, в кариотипе которых присутствует хромосома VI размером около 290 т.п.н. (рис. 13а, дорожки 13 и 14). Хромосомные ДНК штаммов *Saccharomyces*, представленных на рис. 13 и 14, были перенесены на нитроцеллюлозную мембрану для последующей Саузерн-гибридизации. В качестве зондов использовали видовые молекулярные маркеры дрожжей *S. cerevisiae* *ADE1* (хромосома I), *ACT1* (VI) и *TRP5* (VII). У штаммов *S. jurei* зонд *ADE1* гибридизировался с хромосомной полосой размером около 1000 т.п.н., соответствующей дуплету хромосом XVI/XIII (рис. 13б, дорожки 17–19). У остальных семи видов рода *Saccharomyces* гибридизационный сигнал обнаружен на хромосоме I (рис. 13б, дорожки 1–16). Недавно показано, что у вида *S. jurei* имеется реципрокная транслокация между хромосомами I и XIII (Naseeb et al., 2018). Саузерн-гибридизация с зондами *ACT1* (рис. 14б) и *TRP5* (рисунок не приводится) выявила у штаммов *S. jurei* (дорожки 2, 3 и 4) вторую реципрокную транслокацию между хромосомами VI и VII, которая также характерна для вида *S. mikatae* (дорожки 5–10).

Хромосомные ДНК штаммов, представленных на рисунке 13, были также подвергнуты гибридизации с зондом гена *SUC2*. Изученные штаммы дрожжей *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus* и *S. jurei* обладали только одним β -фруктозидазным геном *SUC2*, локализованным в хромосоме IX (рис. 13в, дорожки 1–4, 7–19). Исключением являются штаммы *S. cariocanus* UFRJ 50791 и UFRJ 50816, у которых гибридизационный сигнал обнаружен в районе хромосомы XV стандартного штамма *S. cerevisiae* YNN 295 (рис. 13в, дорожки 5, 6 и 1). Следует отметить, что дрожжи *S. cariocanus* имеют видоспецифичный кариотип за счет наличия четырех реципрокных транслокаций, одна из которых затрагивает хромосомы IX и XV (Naumov et al., 1995a; Fischer et al., 2000).

5.4. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей β -фруктозидаз

Мы сравнили нуклеотидные последовательности β -фруктозидазных генов *SUC2* дрожжей *S. jurei* и остальных видов *Saccharomyces*. Нуклеотидные последовательности генов *SUC2* штаммов *S. jurei* CBS 14759, NCYC 3962 и ВКМ Y-3330 идентичны и сходны с последовательностями генов *SUC* других видов *Saccharomyces* на 84.1–94.6%. Наибольший уровень сходства отмечен с геном *SUCm S. mikatae* (94.6%), а наименьше сходство – с генами *SUCb S. bayanus* (84.1–84.6%) и *SUCa S. arboricola* (84.9%). По полученным нуклеотидным последовательностям генов *SUC* дрожжей *Saccharomyces* были определены аминокислотные последовательности соответствующих белков, состоящих из 514 аминокислотных остатков.

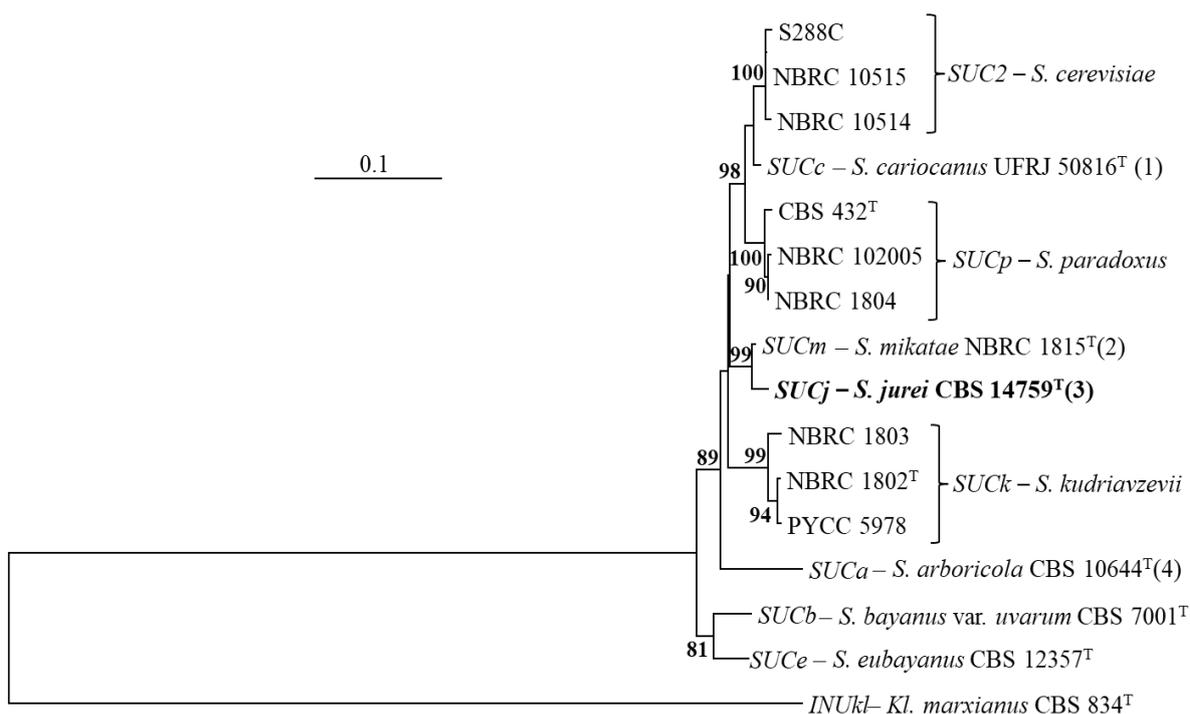


Рисунок 15. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей β -фруктозидаз дрожжей рода *Saccharomyces*. В качестве внешней группы использована β -фруктозидаза (инулиназа) дрожжей *Kluyveromyces marxianus*. Приводятся значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует 100 аминокислотным заменам на 1000 аминокислотных позиций. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов, имеющие идентичные аминокислотные последовательности: (1) – UFRJ 50791; (2) – NBRC 1816; (3) – **NCYC 3962, ВКМ Y-3330**; (4) – AS 2.3318, TJ14M01. Жирным шрифтом отмечены штаммы, нуклеотидные последовательности которых определены в данной работе.

Уровень сходства изученных белков составил от 88.0 до 98.6%. Белки *SUCa* и *SUCb* являются наиболее дивергентными: 88.00–91.6 и 89.2–92% сходства с инвертазами остальных видов *Saccharomyces*. На основании анализа аминокислотных последовательностей генов *SUC2* было построено филогенетическое древо (рис. 15). В качестве внешней группы использовали β -фруктозидазу (инулиназу) дрожжей *Kluveromyces marxianus* CBS 834.

Все изученные β -фруктозидазы дрожжей *Saccharomyces* образовали отдельный кластер относительно внешней группы. Внутри этого кластера выделяются несколько субкластеров. Первый представлен β -фруктозидазами *SUC2 S. cerevisiae*, *SUCc S. cariocanus* и *SUCp S. paradoxus*, уровень сходства между которыми составил 96.1–97.4%.

Второй субкластер образовали инвертазы *SUCm S. mikatae* и *SUCj S. jurei*, которые идентичны на 98.6%. Отдельное положение на древе занимают белки *SUC* дрожжей *S. arboricola*, *S. bayanus* и *S. kudriavzevii*. Следует отметить, что анализ аминокислотных последовательностей β -фруктозидазных генов *SUC* также указывает на близкое генетическое родство видов *S. jurei* и *S. mikatae*.

Таким образом, проведенный мультигенный анализ и молекулярное кариотипирование показали, что недавно описанный вид *S. jurei* филогенетически наиболее близок дрожжам *S. mikatae*, тогда как *S. arboricola* и *S. bayanus* являются наиболее дивергентными видами рода *Saccharomyces*.

5.5. Обсуждение

Проведена молекулярная реидентификация 13 коллекционных штаммов, которые на основании стандартных таксономических тестов были ранее отнесены к трем видам *Saccharomyces*: *S. cerevisiae* (7 штаммов), *S. paradoxus* (4) и *S. bayanus* (2). Молекулярный анализ подтвердил ранее определенную видовую принадлежность только для одного штамма *S. cerevisiae* (UCDFST 61-351) и трех штаммов *S. paradoxus* (UCDFST 51-137, UCDFST 52-225 и UCDFST 61-220). Остальные 6 штаммов, ранее

определенные как *S. cerevisiae*, относятся к виду *S. paradoxus*. Среди изученных дрожжей штаммы *S. bayanus* не обнаружены: штамм UCDFST 61-137 идентифицирован как *S. cerevisiae*, а штамм UCDFST 73-538.2 является межвидовым гибридом *S. cerevisiae* × *S. paradoxus*. Штамм ВКМ Y-3330 отнесен нами к виду *S. jurei*. Это первый случай обнаружения вида *S. jurei* в России. В результате проведенного анализа показано, что на основе ПДРФ-анализа ITS1-5.8S-ITS2-последовательности с использованием эндонуклеазы *Bgl*III можно достоверно дифференцировать дрожжи *S. jurei* от остальных 7 видов *Saccharomyces*.

С помощью молекулярного кариотипирования и сравнительного анализа ряда ядерных и митохондриальных генов проведено молекулярно-генетическое изучение дрожжей *Saccharomyces* различной видовой принадлежности. Мультигенный филогенетический анализ показал, что недавно описанный вид *S. jurei* филогенетически наиболее близок к *S. mikatae*, тогда как *S. bayanus* и *S. arboricola* являются наиболее дивергентными видами рода *Saccharomyces*. Анализ аминокислотных последовательностей β-фруктозидазных генов *SUC*, контролирующих ферментацию сахарозы, также указывает на близкое генетическое родство видов *S. jurei* и *S. mikatae*. Впервые нами проведено молекулярное кариотипирование вида *S. jurei*. В кариотипе *S. jurei* обнаружено две реципрокные хромосомные транслокации, одна из которых (I/XIII) уникальна, а вторая (VI/VII) – общая с дрожжами *S. mikatae*.

ГЛАВА 6. ВНУТРИВИДОВОЙ ПОЛИМОРФИЗМ БИОЛОГИЧЕСКОГО ВИДА *SACCHAROMYCES BAYANUS*

В последнем определителе дрожжей вид *S. bayanus* представлен двумя разновидностями: *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. bayanus* var. *ivarum* (Vaughan-Martini, Martini, 2011). Родственные этим разновидностям дрожжи *S. eubayanus* были описаны на изолятах из Аргентины, а позднее обнаружены в Китае, США, Канаде, Австралии, Новой Зеландии и Ирландии (Libkind et al., 2011; Bing et al., 2014; Peris et al., 2016; Gayevskiy, Goddard, 2016; Nespolo et al., 2020; Bergin et al., 2022). Также, в Новой Зеландии обнаружена популяция *S. bayanus*, штаммы которой по ряду молекулярных маркеров отличаются от *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *ivarum* и *S. eubayanus* (Almeida et al., 2014).

С помощью различных молекулярных методов и гибридологического анализа мы изучили генетическое родство 45 штаммов комплекса *S. bayanus*. Штаммы выделены из промышленных ферментаций и различных природных источников в разных регионах мира: Россия, Нидерланды, Швейцария, Испания, Германия, Франция, Словакия, Венгрия, Молдавия, Аргентина, Китай, США, Австралия и Новая Зеландия (Приложение, Таблица П2).

6.1. ПДРФ-анализ амплифицированных IGS2-фрагментов рДНК

Сначала у штаммов *S. bayanus* различного происхождения была проведена амплификация IGS2-участков рДНК и последующий ПДРФ-анализ с помощью рестриктазы *AluI* (рис. 16). В качестве контроля использовали штаммы *S. cerevisiae* S288C и ВКМ Y-502 (рис. 16а, б дорожки 1 и 2). С помощью этого молекулярного маркера можно четко дифференцировать виды *S. cerevisiae* и *S. bayanus*, а также внутривидовые популяции последнего (рис. 16а дорожки 1, 2 и 3–29; рис. 16б дорожки 1, 2 и 3–16 соответственно). По сходству *AluI*-профилей изученные штаммы *S. bayanus* разделились на пять групп. Первую группу составили штаммы *S. bayanus* var. *ivarum*, имеющие три *AluI*-фрагмента размером 610, 520 и 170

п.н. (рис. 16а дорожки 9–18, рис. 16б дорожки 3, 6 и 7). Идентичные

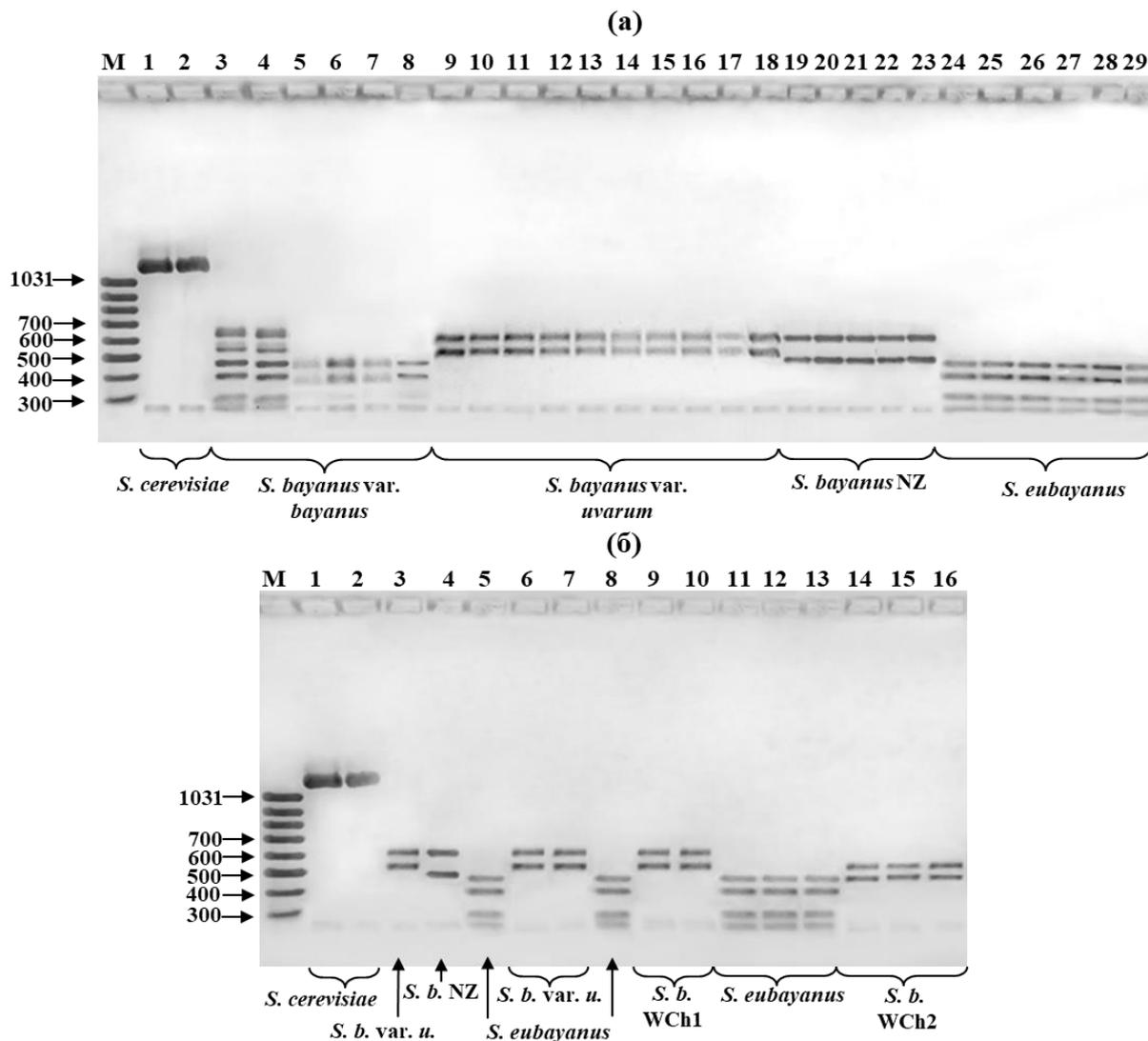


Рисунок 16. Рестрикционный анализ амплифицированных фрагментов межгенного спейсера IGS-2 штаммов *Saccharomyces* с помощью эндонуклеазы *AluI*. Дорожки (а): *S. cerevisiae*: 1 – S288C, 2 – ВКМ Y-502; *S. bayanus* var. *bayanus*: 3 – CBS 380, 4 – S.b.5, 5 – CBS 378, 6 – CBS 424, 7 – CBS 425, 8 – NBRC 1948; *S. bayanus* var. *uvarum* : 9 – ВКМ Y-1146, 10 – М 488, 11 –ВКМ Y-361, 12 – NCAIM Y-00677, 13 – CBS 377, 14 – PJS 2.95, 15 – SCU 11, 16 – 148.01, 17 – UWO(PS) 99-808, 18 – М300; *S. bayanus* NZ: 19 – PYCC 6864, 20 – PYCC 6865, 21 – PYCC 6867, 22 – PYCC 6868, 23 – PYCC 6869; *S. eubayanus*: 24 – CBS 12357, 25 – PYCC 7085, 26 – PYCC 7086, 27 – PYCC – 7087, 28 – PYCC 7089, 29 – yHKS 210. Дорожки (б): *S. cerevisiae*: 1 – S288C, 2 – ВКМ Y-502; 3 – *S. bayanus* var. *uvarum* ВКМ Y-1146; 4 – *S. bayanus* NZ PYCC 6864; 5 – *S. eubayanus* CBS 12357; *S. bayanus* var. *uvarum*: 6 – 4950, 7 – 4976; *S. eubayanus*: 8 – 4940; *S. bayanus* WCh1: 9 – 4962, 10 – 4965; *S. eubayanus*: 11 – 4946, 12 – 4947, 13 – 4948; *S. bayanus* WCh2: 14 – 4969, 15 – 4971, 16 – 4960. М – маркер молекулярных весов (п.н.). “100bp DNA Ladder” (“Fermentas”, Литва).

паттерны имели штаммы *S. bayanus* var. *bayanus* (CBS 378, CBS 424, CBS 425, NBRC 1948) (рис. 16а дорожки 5–8) и *S. eubayanus*: 480, 400, 310 и 170 п.н. (рис. 16а дорожки 24–29; рис. 16б дорожки 5, 8, 11–13). В третью группу

вошли пять штаммов *S. bayanus*, изолированных в Австралии (Тасмания) и Новой Зеландии (далее новозеландская популяция, NZ), у которых средний фрагмент был несколько меньшего размера, чем у *S. bayanus* var. *ivarum*: 500 п.н. (рис. 16а дорожки 19–23, рис. 16б дорожка 4). Четвертая группа представлена типовым штаммом *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 380 и его моноспоровой культурой S.b.5-3A-1B, в *AluI*-профиле которых объединены фрагменты, характерные для *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. bayanus* var. *ivarum* (рис. 16а дорожки 3 и 4). Штаммы *S. bayanus* 4969 (ТТН25L.1), 4971 (HZZt21L.4) и 4960 (LLFM12L.4), выделенные в Западном Китае, сформировали пятую группу и имели: три *AluI*-фрагмента размером около 520, 480 и 170 п.н. (рис. 16б дорожки 14–16). Остальные два штамма 4962 (LLFM15L.2) и 4965 (LZSP3L.1), также выделенные в Западном Китае, не отличались по *AluI*-профилям от *S. bayanus* var. *ivarum* (рис. 16б дорожки 9 и 10). Здесь и далее штаммы *S. bayanus*, выделенные в Западном Китае, обозначены как западнокитайская популяция, WCh: WCh1 (4962, 4965) и WCh2 (4969, 4971, 4960).

Для установления генетического родства штаммов *S. bayanus* с разными *AluI*-профилями были проведены филогенетический и гибридологический анализы.

6.2. Мультигенный филогенетический анализ

Сначала мы провели секвенирование ITS1-участка рДНК у 25 штаммов, выделенных в Аргентине, Новой Зеландии и Китае. Полученные нуклеотидные последовательности сравнили между собой и с ITS1-последовательностями других штаммов *S. bayanus*, депонированными в GenBank (рис. 17). Идентичные ITS1-последовательности имели новозеландские изоляты (NZ) и 15 штаммов *S. bayanus* var. *ivarum*. Исключением является аргентинский штамм *S. bayanus* var. *ivarum* РУСС 7082, имеющий одну уникальную замену. Из 5 изученных штаммов *S. bayanus* var. *bayanus* четыре штамма (CBS 380, CBS 424, CBS 425 и NBRC

1948) имели идентичные ITS1-последовательности, а штамм CBS 378 отличался одной вставкой (рис. 17). Штаммы *S. eubayanus* разделились на две группы. Идентичные ITS1-последовательности имели аргентинские, включая типовую культуру CBS 12357, и североамериканские штаммы. Тибетские и европейский штамм UCD650 имели идентичные ITS1-последовательности, которые не отличались от последовательности типовой культуры *S. bayanus* CBS 380 (рис. 17). Отдельную группу сформировали западнокитайские (WCh) штаммы. Следует отметить, что различия с ITS1-участком штамма *S. cerevisiae* S288C составили более 20 нуклеотидных замен (включая вставки и делеции).

	ITS1				
	22	92	135	161	252
<i>S. bayanus</i> var. <i>uvarum</i> CBS 7001 (1)	-	A	A	G	C
<i>S. bayanus</i> var. <i>uvarum</i> РУСС 7082	-	.	.	T	.
<i>S. bayanus</i> NZ РУСС 6864 (2)	-
<i>S. bayanus</i> var. <i>bayanus</i> CBS 380 (3)	-	.	G	.	T
<i>S. bayanus</i> var. <i>bayanus</i> CBS 378	A
<i>S. eubayanus</i> CBS 12357 (4)	-	.	.	.	T
<i>S. eubayanus</i> UCD650	-	.	G	.	T
<i>S. eubayanus</i> 4940 (6)	-	.	G	.	T
<i>S. bayanus</i> WCh 4960 (5)	-	T	.	.	T

Рисунок 17. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера ITS1 дрожжей комплекса *S. bayanus*. Нумерация последовательности приводится по штамму *S. bayanus* var. *uvarum* CBS 7001. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов, имеющие идентичные нуклеотидные последовательности: (1) – CBS 395, CBS 377, 148.01, ВКМ Y-1146, ВКМ Y-508, M488, UWO(PS) 99-808, ВКМ Y-361, NCAIM Y.00676, PJS2.95, **РУСС 6330, 4950, РУСС 7083, 4976**; (2) – **РУСС 6865, РУСС 6867, РУСС 6868, РУСС 6869**; (3) – CBS 424, CBS 425, NBRC 1948; (4) – yHKS210, yHKS211, yHKS212, **РУСС 7084, РУСС 7085, РУСС 7086, РУСС 7087, РУСС 7088, РУСС 7089**; (5) – **4962, 4965, 4969, 4971**; (6) – **4946, 4947, 4948**. Жирным шрифтом отмечены штаммы, нуклеотидные последовательности которых определены в данной работе.

Для установления генетического родства изученных штаммов мы провели комплексный анализ нуклеотидных последовательностей ITS1-участков, трех ядерных (*FSY1*, *HIS3*, *MET2*) и двух митохондриальных (*FUN14*, *COX2*) генов (рис. 18–20).

На филогенетическое древо, построенное по нуклеотидным последовательностям генов *FSY1*, *HIS3*, *MET2* и ITS1-участка, со 100%-ной статистической поддержкой выделяются два кластера (рис. 18). Один из кластеров подразделен на два подкластера, в одном из которых четко

дифференцированы две группы штаммов: группа штаммов *S. bayanus* var. *bayanus* и сборная группа аргентинских, североамериканских, европейских и тибетских штаммов вида *S. eubayanus*; причем эти штаммы различного географического происхождения имеют как идентичные последовательности, так и отличаются 1–13 нуклеотидами. Максимальное количество замен приходится на ген *FSY1*. Второй подкластер сформировали выделенные в Западном Китае штаммы *S. bayanus*, которые имеют 17–58 нуклеотидных замен относительно типовой культуры CBS 12357; наибольшее количество замен также отмечено по последовательностям гена *FSY1*.

Второй кластер также дифференцирован на два подкластера: штаммы *S. bayanus* var. *ivarum* и новозеландские штаммы *S. bayanus*, нуклеотидные последовательности которых различаются 17–56 заменами; при этом наибольшие различия также отмечены по последовательностям гена *FSY1*. В пределах каждого подкластера штаммы, как правило, имели идентичные последовательности или различались 1–8 заменами. Интересно, что штамм *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 425, выделенный из яблочного сока в Швейцарии, показал ближайшее родство с подкластером штаммов *S. bayanus* var. *ivarum*.

На филогенетическом древе, построенном по нуклеотидным последовательностям митохондриальных генов *FUN14* и *COX2* также дифференцированы два кластера (рис. 19). Первый кластер подразделен на два подкластера. В первом подкластере три штамма *S. bayanus* var. *bayanus* (CBS 424, CBS 425, NBRC 1948) объединились с европейским и тибетскими штаммами *S. eubayanus*, а два штамма (CBS 378 и CBS 380) – с *S. bayanus* var. *ivarum*. Последовательности гена *FUN14* не отличались у трех штаммов *S. bayanus* var. *bayanus* (CBS 380, NBRC 1948 и CBS 425), штаммов тибетской линии, а также типового и европейского штаммов *S. eubayanus*. Тибетские изоляты так же не отличались по последовательностям гена *COX2* от *S. bayanus* var. *bayanus* NBRC 1948, тогда как отличие с геном *COX2* типовой культуры *S. eubayanus* CBS 12357 составило 19 нуклеотидных замен. Европейский штамм имел три отличия в нуклеотидной последовательности

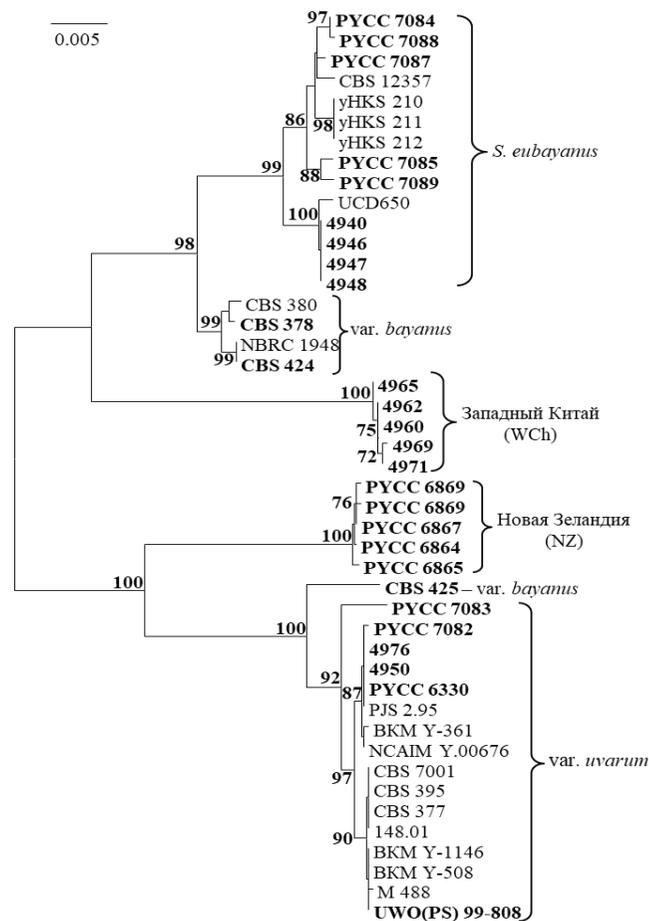


Рисунок 18. Филогенетическое древо, построенное по нуклеотидным последовательностям ITS1-участка и ядерных (*FSY1*, *HIS3*, *MET2*) генов дрожжей комплекса *Saccharomyces bayanus*. Приводятся значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует пяти нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. Жирным шрифтом отмечены штаммы, нуклеотидные последовательности которых определены в данной работе.

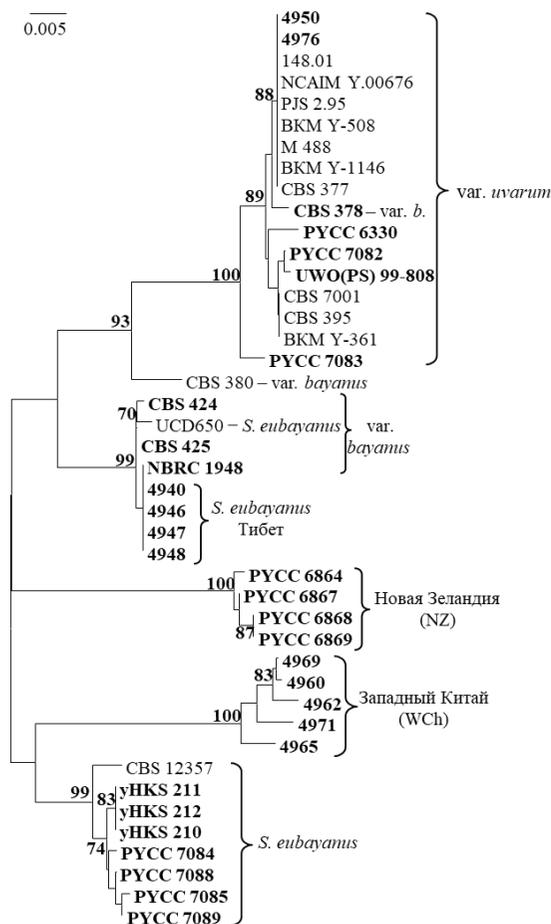


Рисунок 19. Филогенетическое древо, построенное по нуклеотидным последовательностям митохондриальных (*FUN14*, *COX2*) генов дрожжей комплекса *Saccharomyces bayanus*. Приводятся значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует пяти нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. Жирным шрифтом отмечены штаммы, нуклеотидные последовательности которых определены в данной работе.

гена *COX2* с тибетскими штаммами; с геном *COX2* типового штамма *S. eubayanus* было 22 отличия. Второй подкластер сформировали штаммы новозеландской популяции.

На рис. 20 представлено филогенетическое дерево, построенное по нуклеотидным последовательностям ядерных и митохондриальных генов. Следует отметить, что штаммы новозеландской и западнокитайской популяций на всех трех филогенетических деревьях сформировали отдельные кластеры со статистической поддержкой 100%. Штаммы новозеландской популяции значительно отличались от *S. bayanus* var. *ivarum* по нуклеотидным последовательностям пяти проанализированных генов: 55–56 замен в гене *FSY1*, 16–18 замен в гене *MET2*, 24–26 замены в гене *HIS3*, 21 замена в гене *FUN14* и 43–46 нуклеотидные замены в гене *COX2*. Различий между дрожжами *S. eubayanus*, *S. bayanus* var. *bayanus* и западнокитайской популяцией было значительно больше. Западнокитайские штаммы значительно отличались от североамериканских, аргентинских и тибетских штаммов *S. eubayanus* по нуклеотидным последовательностям пяти проанализированных генов: 57–58 замен в гене *FSY1*, 17–18 в гене *MET2*, 27 замен в гене *HIS3*, 19–20 замен в гене *FUN14* и 21–28 замен в гене *COX2*. Сопоставимое количество отличий было с некоторыми штаммами *S. bayanus* var. *bayanus* в последовательностях генов *FSY1*, *HIS3*, *FUN14*. С другими представителями комплекса *S. bayanus* западнокитайская популяция имела еще большее количество отличий. Европейский штамм *S. eubayanus* UCD650 оказался филогенетически наиболее близким к группе тибетских штаммов.

Таким образом, согласно проведенному мультигенному филогенетическому анализу можно сделать заключение о том, что комплексный вид *S. bayanus* включает 5 генетически дифференцированные популяции: *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *ivarum*, *S. eubayanus*, западнокитайская (WCh) и новозеландская (NZ) популяции.

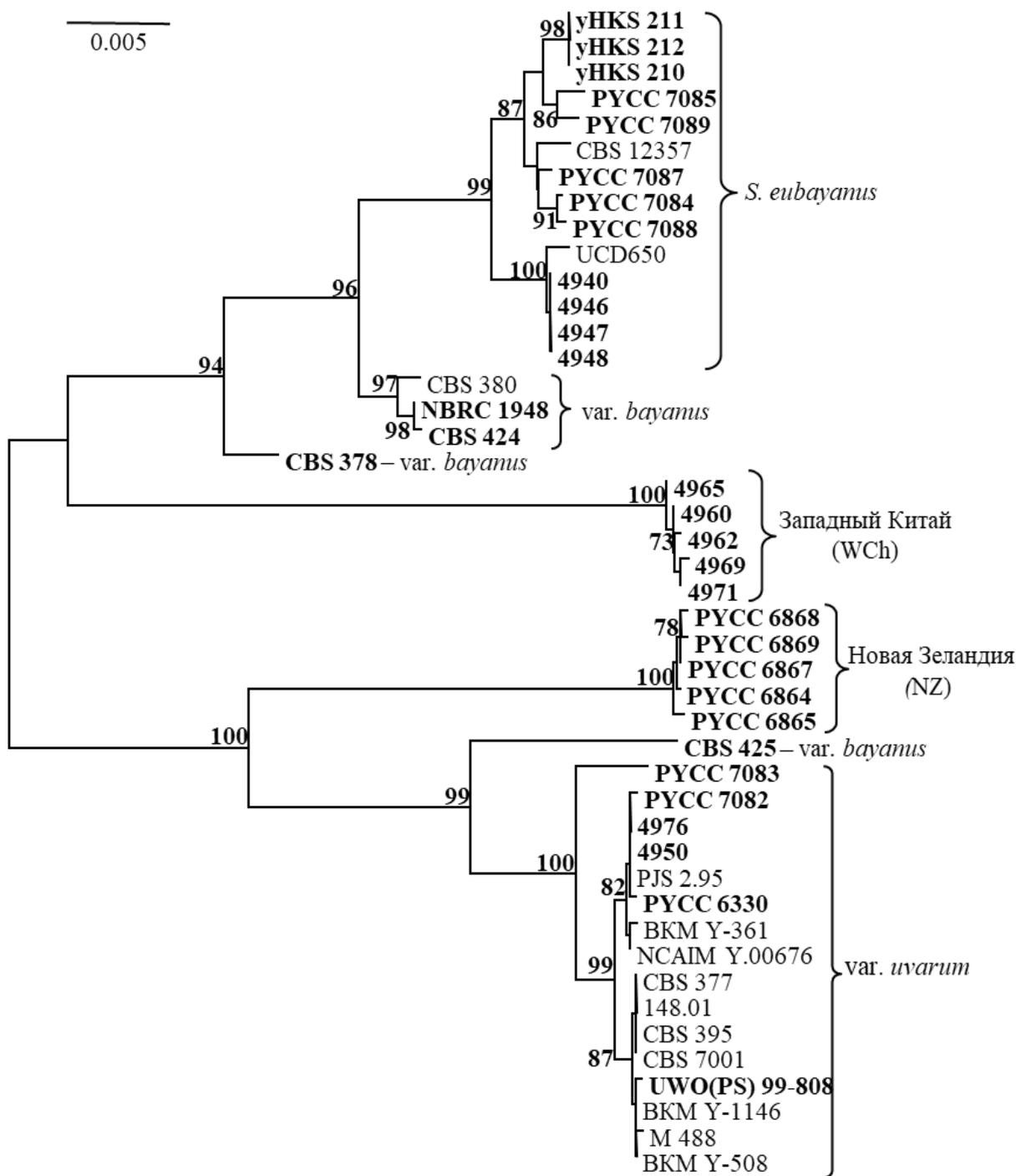


Рисунок 20. Комплексный филогенетический анализ ITS1-участка, ядерных (*FSY1*, *HIS3*, *MET2*) и митохондриальных (*FUN14*, *COX2*) генов дрожжей комплекса *Saccharomyces bayanus*. Приводятся значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует пяти нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. Жирным шрифтом отмечены штаммы, нуклеотидные последовательности которых определены в данной работе.

6.3. Молекулярное кариотипирование и Саузерн-гибридизация

Мы сравнили молекулярные кариотипы 38 штаммов дрожжей комплекса *S. bayanus* из разных популяций. Кариотипы некоторых из них представлены на рис. 21 и 22. Идентификацию отдельных хромосомных полос проводили по кариотипу стандартного штамма *S. cerevisiae* YNN 295, имеющего известные размеры и порядок расположения хромосом (рис. 21а, 22а дорожка 1). Новозеландские штаммы имеют сходные кариотипические профили, незначительный полиморфизм размеров отмечен только для хромосомных полос размером 2200–770 т.п.н. (рис. 21а, дорожки 12–15). Эти штаммы имеют в своем кариотипе три хромосомные полосы размером 245–370 т.п.н., вместо двух у *S. bayanus* var. *ivarum* (дорожки 10 и 11). Все изученные штаммы *S. eubayanus* и западнокитайской популяции также характеризовались наличием трех хромосом размером 245–370 т.п.н. (рис. 21а, дорожки 7–9; рис. 22а, дорожки 3–13). Основные отличия в кариотипах штаммов *S. eubayanus* касались размера хромосомной полосы, соответствующей дуплету хромосом XV и VII (~1125 т.п.н.) контрольного штамма *S. cerevisiae*. У четырех тибетских штаммов *S. eubayanus* (4940, 4946, 4947, 4948) она была несколько большего размера (рис. 22а, дорожки 10–13). Три штамма *S. bayanus* var. *bayanus* (CBS 380, CBS 424 и CBS 425) характеризовались тремя хромосомными полосами размером 245–370 т.п.н., тогда как у штаммов CBS 378 и NBRC 1948 имеется, соответственно, две и одна хромосомные полосы (рис. 21а, дорожки 2–4, 5 и 6). Согласно интенсивности свечения окрашенных бромистым этидием полос, нижние хромосомные полосы штаммов CBS 378 и NBRC 1948 могут содержать несколько хромосом. Действительно, с помощью одноступенчатого режима кариотипирования удалось разделить на две хромосомы нижнюю полосу штамма NBRC 1948 и хромосомную полосу размером около 370 т.п.н. у штамма CBS 378 (рисунок не приводится).

Хромосомные ДНК изученных штаммов были перенесены с помощью Саузерн-блотинга на нитроцеллюлозную мембрану для последующей

гибридизации с зондом *ACT1* (хромосома VI) дрожжей *S. cerevisiae* (рис. 21б, 22б). У всех изученных штаммов *S. eubayanus*, западнокитайской и новозеландской популяций, а также у трех штаммов *S. bayanus* var. *bayanus* (CBS 380, CBS 424 и CBS 425) зонд *ACT1* гибридизовался с хромосомной полосой размером около 290 т.п.н., которая соответствует хромосоме VI кариотипического стандарта *S. cerevisiae* YNN 295 (рис. 21б, 22б, дорожка 1). У штамма *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 378 выявлено два гибридизационных сигнала: var. *bayanus*-типа и var. *ivarum*-типа (рис. 21б, дорожка 5). У штамма NBRC 1948 и всех изученных штаммов *S. bayanus* var. *ivarum* обнаружен только один гибридизационный сигнал в районе хромосомы ~580 т.п.н. (рис. 21б, дорожки 6, 10 и 11, рис. 22б, дорожки 14–16).

Таким образом, реципрокная транслокация между хромосомами VI и X характерна только для *S. bayanus* var. *ivarum* и отсутствует у штаммов *S. eubayanus*, западнокитайской и новозеландской популяций. Среди дрожжей *S. bayanus* var. *bayanus* встречаются штаммы обоих типов.

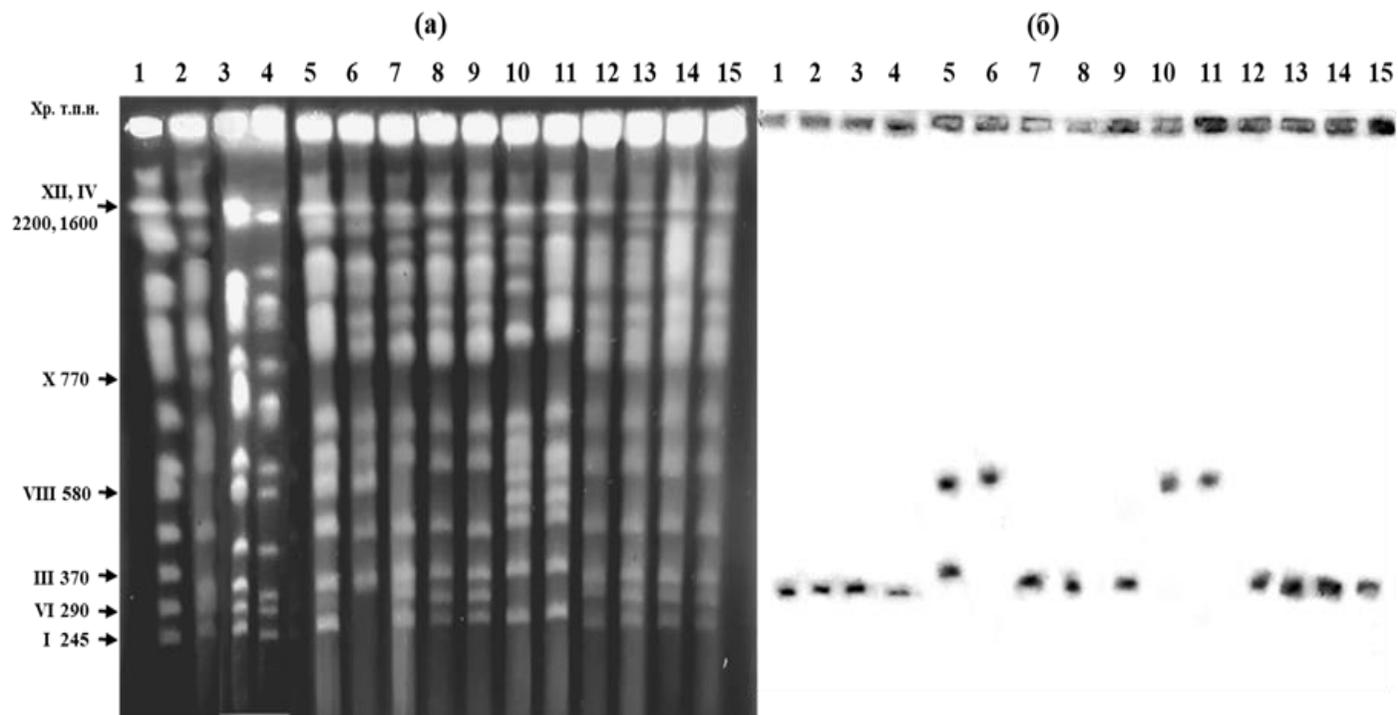


Рисунок 21. Пульс-электрофорез (а) и Саузерн-гибридизация (б) хромосомной ДНК дрожжей комплекса *Saccharomyces bayanus* с зондом *ACT1* дрожжей *S. cerevisiae*. Дорожки: *S. bayanus* var. *bayanus*: 2 – CBS 380, 3 – CBS 424, 4 – CBS 425, 5 – CBS 378, 6 – NBRC 1948; *S. eubayanus*: 7 – CBS 12357, 8 – уНКС210, 9 – РУСС 7086; *S. bayanus* var. *ivarum*: 10 – CBS 7001, 11 – CBS 395; новозеландская популяция *S. bayanus*: 12 – РУСС 6864, 13 – РУСС 6867, 14 – РУСС 6868, 15 – РУСС 6869. Нумерация и размеры хромосом приводятся согласно стандартному штамму *S. cerevisiae* YNN295 (дорожка 1).

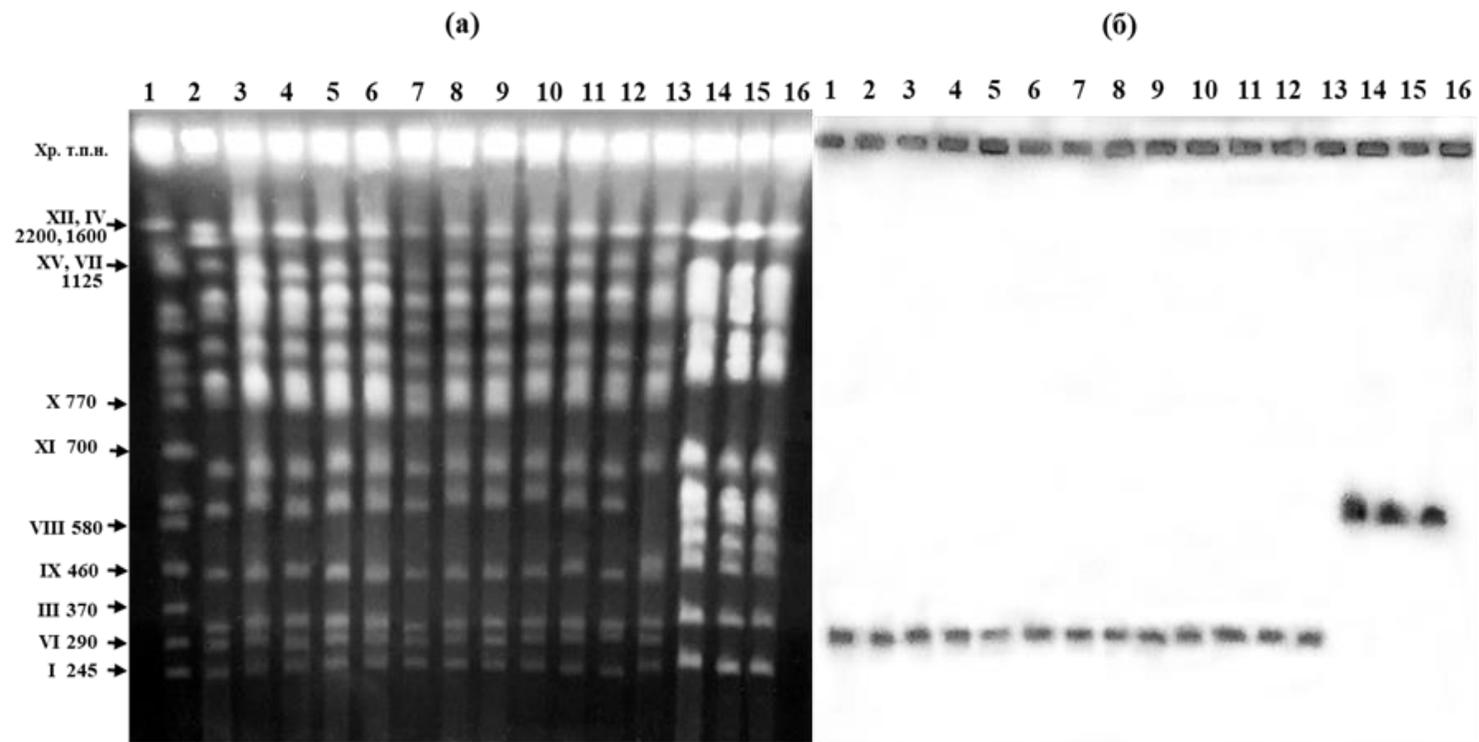


Рисунок 22. Пульс-электрофорез (а) и Саузерн-гибридизация (б) хромосомной ДНК дрожжей комплекса *Saccharomyces bayanus* с зондом *ACT1* дрожжей *S. cerevisiae*. Дорожки: *S. bayanus* var. *bayanus*: 2 – CBS 425; *S. eubayanus*: 3 – CBS 12357, 4 – уНКС212; западнокитайская популяция *S. bayanus*: 5 – 4960, 6 – 4962, 7 – 4965, 8 – 4969, 9 – 4971; *S. eubayanus*: 10 – 4940, 11 – 4946, 12 – 4947, 13 – 4948; *S. bayanus* var. *ivarum*: 14 – CBS 395, 15 – 4950, 16 – 4976. Нумерация и размеры хромосом приводятся согласно стандартному штамму *S. cerevisiae* YNN295 (дорожка 1).

6.4. Сравнительный анализ α -галактозидазных генов *MEL* ферментации мелибиозы

Признак ферментации мелибиозы характерен для трех видов *Saccharomyces* – *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. mikatae* и гибридных пивных дрожжей *S. pastorianus*. Редкие Mel^+ -штаммы встречаются среди дрожжей *S. cerevisiae* и *S. paradoxus* (Наумова и др., 2011).

Мы провели сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей α -галактозидазных генов *MEL* у штаммов *S. bayanus* различного происхождения. Гены *MEL* были секвенированы у пяти штаммов *S. bayanus* var. *ivarum* (РУСС 6330, РУСС 7082, РУСС 7083, 4950, 4976), пяти штаммов *S. bayanus* новозеландской популяции (РУСС 6864, РУСС 6865, РУСС 6867, РУСС 6868, РУСС 6869,) 13 штаммов *S. eubayanus* (РУСС 7084, РУСС 7085, РУСС 7086, РУСС 7087, РУСС 7088, РУСС 7089, 4940, 4946, 4947, 4948, уНКС210, уНКС211, уНКС212) и пяти западнокитайских штаммов *S. bayanus* (4960, 4962, 4965, 4969, 4971). Полученные нуклеотидные последовательности сравнили между собой и с α -галактозидажными последовательностями других штаммов комплекса *S. bayanus*, депонированными в базе данных GenBank.

Дрожжи *S. bayanus* var. *bayanus* различаются по способности ферментировать мелибиозу (Vaughan-Martini, Martini, 2011). Все изученные нами штаммы *S. bayanus* var. *bayanus* были проверены по способности сбраживать мелибиозу в бродильных трубках с поплавками, а штаммы фенотипа Mel^- были подвергнуты Саузерн-гибридизации с зондом *MELb*. Штаммы NBRC 1948, CBS 378 и CBS 424 не сбраживают мелибиозу и даже не имеют молчащих последовательностей генов *MEL*. Типовая культура CBS 380 и штамм CBS 425 слабо сбраживают мелибиозу, нуклеотидные последовательности их генов *MEL* идентичны между собой и отличаются от последовательностей *S. bayanus* var. *ivarum* и *S. eubayanus*, соответственно, 4–22 и 69–71 заменами. В свою очередь, *MEL*-последовательности штаммов

S. bayanus var. *ivarum* были идентичны или отличались 1–20 заменами. Сходные нуклеотидные последовательности имели аргентинские, североамериканские, тибетские и европейский штаммы *S. eubayanus* (1–6 замен). Различия между генами *MEL S. bayanus* var. *ivarum* и *S. eubayanus* составили от 71 до 73 нуклеотидов.

Новозеландские штаммы, имеющие идентичные последовательности генов *MEL* (за исключением штамма РУСС 6864 с 3 заменами), значительно отличались от остальных штаммов *S. bayanus*: 45–47 замен с *S. bayanus* var. *bayanus*, 41–45 замен с *S. bayanus* var. *ivarum* и 66–70 замен с *S. eubayanus*. Мелибиозные гены западнокитайских штаммов *S. bayanus* также существенно отличались от других представителей комплекса *S. bayanus*: 112–113 нуклеотидных замен с *S. bayanus* var. *bayanus*, 111–113 замен с *S. bayanus* var. *ivarum*, 93–96 замен с *S. eubayanus*, 107–108 замен с *S. bayanus* NZ. В нуклеотидных последовательностях генов *MEL* западнокитайских штаммов было обнаружено три стоп-кодона: TAA, TAA и TAG.

По нуклеотидным последовательностям генов *MEL* были определены аминокислотные последовательности соответствующих белков из 417 аминокислотных остатков. В филогенетический анализ были также включены последовательности α -галактозидаз *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. arboricola*, *S. mikatae* и *S. kudriavzevii*, а также видов *Zygorhynchus*, *Torulopsis* и *Lachancea*. В качестве внешней группы были использованы α -галактозидазы дрожжей *Debaryomyces hansenii*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Schizosaccharomyces pombe* (рис. 23).

Относительно внешней группы, на филогенетическом дереве выделяются три кластера. Первый кластер со 100%-ной статистической поддержкой объединяет α -галактозидазы дрожжей рода *Saccharomyces*. Этот кластер разделен на четыре подкластера. Один из них представлен белками *MEL* дрожжей комплекса *S. bayanus* со 100%-бутстреп поддержкой. У дрожжей *S. bayanus* var. *ivarum* выявлено 6 типов аминокислотных последовательностей α -галактозидаз: MELu1 (NCYC 686), MELu2 (CBS7001,

CBS 395, ВКМ Y-1146, CBS 377, ВКМ Y-508, 4950, 4976), MELu3 (UWO(PS) 99-808, PYCC 6330, PYCC 7082), MELu4 (136.01), MELu5 (148.01, M488, ВКМ Y-361, PYCC 7083) и MELu6 (NCAIM Y.00676), сходство которых составляет 98.3–100%: от 1 до 7 аминокислотных замен. α -Галактозидазы *S. bayanus* var. *bayanus* (MELb) и *S. bayanus* var. *ivarum* (MELu1–MELu6) сходны на 98.8–99.8%. Белок MELu7 (новозеландская популяция) имеет 97.4–98.6% идентичности с MELu1–MELu6 и 98.1% с MELb белком. Белки гибридных дрожжей *S. pastorianus* MELpt (CBS 1538) и MELx (CBS 1513) отличаются 4 а.о. (99% сходства). Их сходство с белками MELu1–MELu6 *S. bayanus* var. *ivarum*, MELb *S. bayanus* var. *bayanus* и MELu7 новозеландской популяции составило, соответственно, 94.5–95.9%, 95–95.9% и 95.4–96.2%.

Аргентинские, североамериканские, тибетские и европейский штаммы *S. eubayanus* (CBS 12357, yHKS210, yHKS211, yHKS212, PYCC 7087, PYCC 7084, PYCC 7086, PYCC 7088, PYCC 7085, PYCC 7089, 4940, 4946, 4947, 4948, UCD650) имели идентичные последовательности MELeu1. У западнокитайских штаммов выявлено два типа последовательностей: mel1⁰ (4962, 4960, 4969), mel2⁰ (4965, 4971). Сходство MELeu1 с α -галактозидазами MELu1–MELu6, MELb и MELu7 составило, соответственно, 95.2–95.9%; 95.9 и 96.4%. Белки MELeu1, MELpt и MELx идентичны на 99%.

Наиболее дивергентными оказались аминокислотные последовательности западнокитайских штаммов, которые идентичны между собой на 99.8%, но имеют значительные различия с белками других штаммов: 87.5–88.7% сходства с MELu1–MELu6; 88.7–89% с MELu7; 87.8–88% с MELb; 88–89% с MELpt и MELx; 89–89.2% с MELeu1.

В базе данных GenBank нами обнаружены нуклеотидные последовательности генов *MEL* двух штаммов *S. kudriavzevii*. Белки MELku1 (PYCC 5978) и MELku2 (yHKS 300), идентичные на 99.8%, сформировали второй подкластер. Третий подкластер включает белки MELj *S. mikatae* и MELa *S. arboricola*, которые идентичны на 87.5%. Следует отметить низкую

статистическую поддержку этого подкластера. Сходство с α -галактозидазами *S. kudriavzevii* было, соответственно, 85.9–86.1% и 85.1–85.4%.

Четвёртый подкластер включает α -галактозидазы дрожжей *S. cerevisiae* и *S. paradoxus*: 84.2–86.1% сходства. Белки MELp1, MELp2 и MELp3 дрожжей *S. paradoxus* идентичны на 95.9–99%. Сходство α -галактозидаз *S. cerevisiae* составляет 96.4–97.1%. α -Галактозидазы дрожжей комплекса *S. bayanus* сходны с белками MEL других видов *Saccharomyces* на 75.8–88.5%.

К первому кластеру примыкают α -галактозидазы дрожжей *Zygorhizoglyphus trapeziformis* (MELr) и *Torulopsis delbrueckii* (MELt), идентичные на 74.7%.

Пять видов *Lachancea* разделились между вторым и третьим кластером. Второй кластер сформировали α -галактозидазы *L. kluyveri*, идентичные на 82.9–99.5%. В третий кластер вошли белки MEL дрожжей *L. quebecensis*, *L. dasiensis*, *L. nothofagi*, *L. cidri*: 70.3–99.8% сходства. В целом α -галактозидазы видов рода *Lachancea* имеют 67.2–83.6% идентичности. Белки MEL дрожжей *Saccharomyces* и *Lachancea* сходны на 63.1–71.8%.

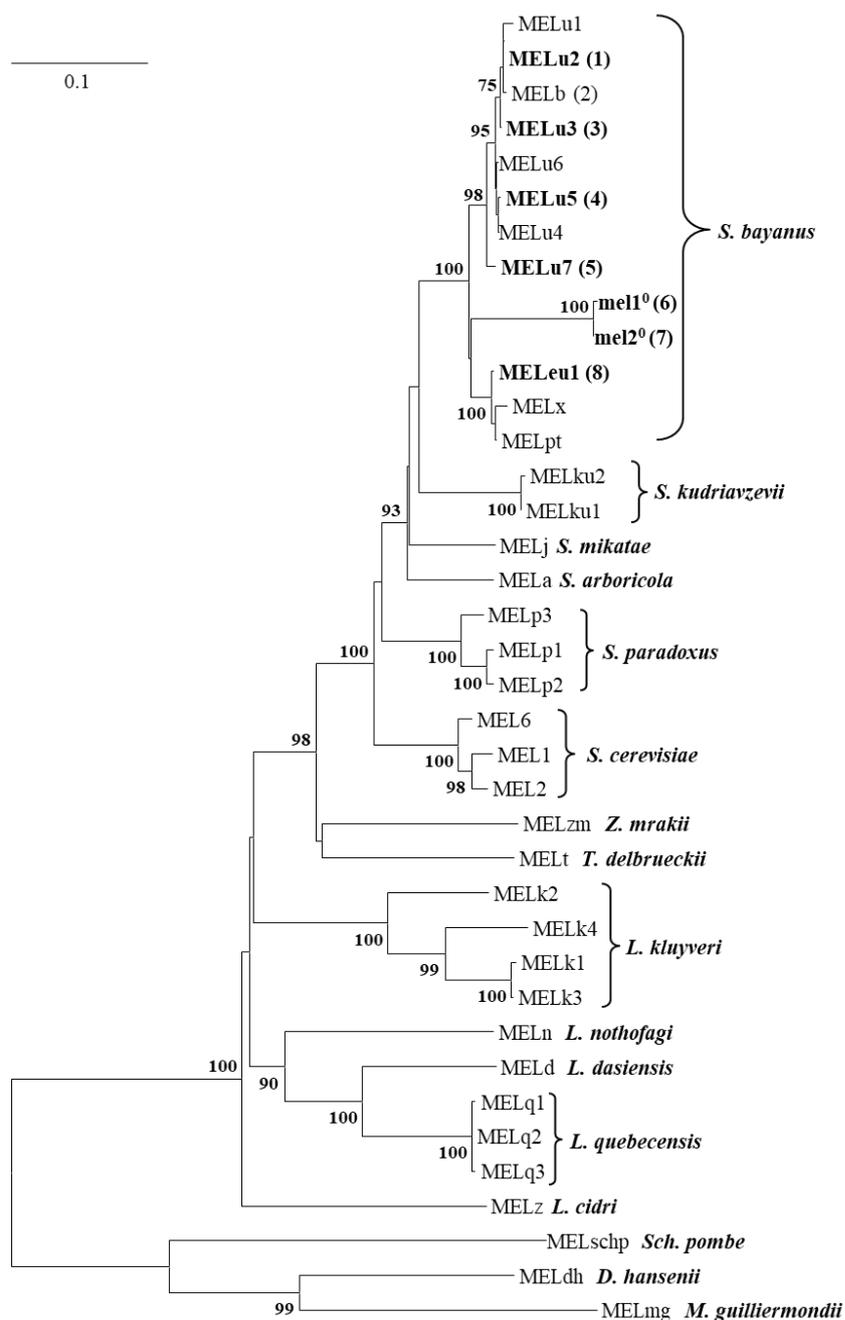


Рисунок 23. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей α -галактозидаз дрожжей рода *Saccharomyces* и близкородственных родов дрожжей *Lachancea*, *Zygotorulasporea* и *Torulasporea*. В качестве внешней группы использованы α -галактозидазы дрожжей *Debaryomyces hansenii*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Schizosaccharomyces pombe*. Приводятся значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует 100 аминокислотным заменам на 1000 аминокислотных позиций. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов, имеющие идентичные аминокислотные последовательности: (1) – CBS 395, CBS 7001, ВКМ Y-1146, CBS 377, ВКМ Y-508, **4950**, **4976**; (2) – CBS 380, CBS 425; (3) –UWO(PS) 99-808, **РУСС 6330**, **РУСС 7082**; (4) – 148.01, M488, ВКМ Y-361, **РУСС 7083**; (5) – **РУСС 6864**, **РУСС 6865**, **РУСС 6867**, **РУСС 6868**, **РУСС 6869**; (6) – **4962**, **4960**, **4969**; (7) – **4965**, **4971**; (8) – **уHKS 210**, **уHKS 211**, **уHKS 212**, **РУСС 7087**, **РУСС 7084**, **РУСС 7086**, **РУСС 7088**, **РУСС 7085**, **РУСС 7089**, **4940**, **4946**, **4947**, **4948**, UCD650. Жирным шрифтом отмечены штаммы, нуклеотидные последовательности которых определены в данной работе.

6.5. Гибридологический анализ

Для определения генетического родства генетических популяций комплекса *S. bayanus* был проведен гибридологический анализ. Прежде всего были созданы гомозиготные моноспоровые культуры штаммов *S. bayanus*: РУСС 6867, РУСС 6868, РУСС 6869 (*S. bayanus* NZ); РУСС 7083 (*S. bayanus* var. *ivarum*); NBRC 1948 (*S. bayanus* var. *bayanus*); 4962, 4965, 4969, 4971 (*S. bayanus* WCh), имеющие высокую выживаемость аскоспор: 79.2–100% (таб. 2). Несколько пониженную выживаемость аскоспор имела только моноспоровая культура новозеландского штамма РУСС 6868 (53.6%). Полученные моноспоровые культуры были маркированы ауксотрофными мутациями *lys* и *ura*. В скрещиваниях также использовали ранее полученные ауксотрофные мутанты штаммов *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 424, *S. bayanus* var. *ivarum* (CBS 7001, NCAIM Y.00677, UWO(PS) 99-808) и *S. eubayanus* CBS 12357 (Naumova et al., 2005; Наумов, 2017; Kaneko, Vanno, 1989).

Гибриды были получены между штаммами пяти популяций комплекса *S. bayanus*: *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *ivarum*, *S. eubayanus*, западнокитайской и новозеландской. Гибридная природа межпопуляционных гибридов была подтверждена ПДРФ-анализом межгенного спейсера IGS2 с помощью эндонуклеазы *AluI* (рис. 24).

Все полученные гибриды спорулировали и были пригодны для тетрадного анализа. Результаты гибридологического анализа внутрипопуляционных гибридов представлены в табл. 3. Следует отметить, что выживаемость гибридных аскоспор была неодинаковой в различных популяциях. Гибрид новозеландских штаммов РУСС 6867 × РУСС 6869 был достаточно фертилен (68.1% выживаемости аскоспор), тогда как при скрещивании штаммов *S. bayanus* var. *bayanus* NBRC 1948 × CBS 424 выявлена пониженная выживаемость гибридных аскоспор – 23.4%.

Таблица 2. Жизнеспособность аскоспор изучаемых штаммов комплекса *S. bayanus*.

Штамм	Выживаемость аскоспор, %
PYCC 6867-2B-4ura	85.7
PYCC 6868-2A	53.6
UWO(PS) 99-808-3-5D-(1)-lys	100
CBS 7001 <i>lys2-2</i>	85.7
NCAIM Y.00677-5-2lys	100
CBS 12357-2B-lys43	97.2
PYCC 6869-4C-1lys	83.3
CBS 424 <i>ade</i>	64*
NRRL 1948-3C- <i>mel</i>	100
NRRL 1948-1B-4A-1ura	91.7
NRRL 1948-1B-4C-1ura	83.3
PYCC 7083-5A-8ura	100
4962ura1	87.5
4962ura4	95.8
4962lys2	87.5
4969lys1	79.2
4969lys3	83.3
4971lys6	95.8
4965ura3	80.0
4969ura5	79.2

*(Наумов, 2017).

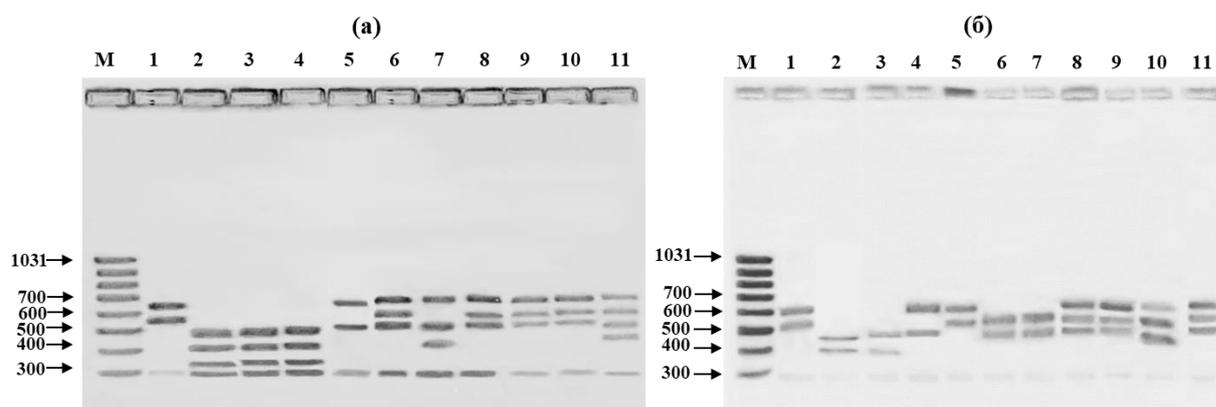


Рисунок 24. Рестрикционный анализ амплифицированных фрагментов межгенного спейсера IGS2 гибридов F1 штаммов комплекса *Saccharomyces bayanus* с помощью эндонуклеазы *AluI*. Дорожки (а): 1 – CBS 7001, 2 – CBS 424, 3 – CBS 12357, NBRC 1948, 5 – PYCC 6867, 6 – 6867×7001, 7 – 6867×12357, 8 – 6867×99-808, 9 – 6867×00677, 10 – 6868×7001, 11 – 7083×12357. Дорожки (б): 1 – CBS 7001, 2 – NBRC 1948, 3 – CBS 12357, 4 – PYCC 6867, 5 – 4962, 6 – 4971, 7 – 4969, 8 – 4971×6867, 9 – 4969×6867, 10 – 4969×1948, 11 – 6867×4969. М – маркер молекулярных весов (п.н.). “100bp DNA Ladder” (“Fermentas”, Литва).

По выживаемости гибридных аскоспор штаммы западнокитайской популяции разделились на те же две группы, что и по *AluI*-рестрикционным профилям: WCh1 (4962, 4965) и WCh2 (4969, 4971, 4960). Внутри каждой из групп выживаемость гибридных аскоспор составила 56.0 и 56.6% соответственно, тогда как гибриды между штаммами из различных групп были слабо фертильными с выживаемостью аскоспор не более 32.1–36.8%. Следует отметить, что во всех гибридных комбинациях наблюдалось регулярное мейотическое расщепление контрольных ауксотрофных маркеров (таб. 3).

Таблица 3. Анализ внутривидовых гибридов дрожжей комплекса *S. bayanus*: *S. bayanus* var. *bayanus* (CBS 424, NBRC 1948), новозеландской (РУСС 6867, РУСС 6869) и западнокитайской (4962, 4965, 4969, 4971) популяций.

Происхождение гибридов и их генотипы	Число изолированных тетрад	Жизнеспособность аскоспор, %	Мейотическое расщепление гибридов			
			aB	Ab	AB	ab
<i>S. bayanus</i> var. <i>bayanus</i>						
1948 <i>ADE</i> × 424 <i>ade</i>	31	23.4	17 <i>ADE</i> : 12 <i>ade</i>			
Новозеландская популяция						
6867 <i>ura</i> × 6869 <i>lys</i>	36	68.1	3P:12N:4T*			
Западнокитайская популяция						
4962 <i>lys2</i> × 4965 <i>ura3</i>	21	56.0	1P:2N:1T*			
4969 <i>ura5</i> × 4971 <i>URA</i>	19	56.6	4P*			
4962 <i>ura4</i> × 4969 <i>lys1</i>	20	32.5	3	3	9	11
4962 <i>ura4</i> × 4969 <i>lys3</i>	19	36.8	8	4	9	7
4962 <i>ura4</i> × 4971 <i>lys6</i>	21	32.1	7	6	7	7

*Соотношение тетрад родительского (P), неродительского (N) дитипов и тетратипа (T).

Результаты межпопуляционных скрещиваний представлены в табл. 4. При скрещивании *S. bayanus* var. *bayanus* NBRC 1948 × *S. bayanus* var. *ivarum* (CBS 7001) обнаружена достаточно высокая выживаемость гибридных аскоспор – 54.5%. В то же время, гибрид с *S. eubayanus* характеризовался низкой фертильностью: 17.1% (таб. 4). Практически стерильный гибрид образовывали дрожжи *S. eubayanus* и *S. bayanus* var. *ivarum* (РУСС 7083 × CBS 12357) – только 2.5%.

Таблица 4. Гибридологический анализ межпопуляционных гибридов дрожжей комплекса *S. bayanus*: *S. bayanus* var. *bayanus* (CBS 424, NBRC 1948), *S. bayanus* var. *ivarum* (CBS 7001, NCAIM Y.00677, UWO(PS) 99-808 и РУСС 7083), *S. eubayanus* (CBS 12357), новозеландская (РУСС 6867, РУСС 6869) и западнокитайская (4962, 4965, 4969, 4971) популяции.

Происхождение гибридов и их генотипы	Число изолированных тетрад	Жизнеспособность аскоспор, %	Мейотическое расщепление гибридов			
			aB	Ab	AB	ab
<i>S. bayanus</i> var. <i>bayanus</i> × <i>S. bayanus</i> var. <i>ivarum</i>						
1948 <i>LYS</i> × 7001 <i>lys</i>	35	54.3	44 <i>LYS</i> : 32 <i>lys</i>			
<i>S. bayanus</i> var. <i>bayanus</i> × <i>S. eubayanus</i>						
1948 <i>ura</i> × 12357 <i>lys</i>	19	17.1	2	4	5	2
<i>S. bayanus</i> var. <i>ivarum</i> × <i>S. eubayanus</i>						
7083 <i>ura</i> × 12357 <i>lys</i>	20	2.5	0	2	0	0
Новозеландская популяция × <i>S. bayanus</i> var. <i>ivarum</i>						
6867 <i>ura</i> × 7001 <i>lys</i>	136	11.4	11	24	22	5
6867 <i>ura</i> × 00677 <i>lys</i>	105	6.2	1	12	9	4
6867 <i>ura</i> × 99-808 <i>lys</i>	101	23.3	10	19	37	28
Новозеландская популяция × <i>S. bayanus</i> var. <i>bayanus</i>						
6867 <i>ADE</i> × 424 <i>ade</i>	35	18.6	10 <i>ADE</i> : 16 <i>ade</i>			
6869 <i>lys</i> × 1948 <i>ura</i>	29	19.0	6	6	3	7
Новозеландская популяция × <i>S. eubayanus</i>						
6867 <i>ura</i> × 12357 <i>lys</i>	118	19.5	14	34	31	13
Западнокитайская популяция × <i>S. eubayanus</i>						
4962 <i>ura1</i> × 12357 <i>lys</i>	30	24.2	7	5	8	9
4969 <i>ura5</i> × 12357 <i>lys</i>	18	19.4	2	5	5	2
Западнокитайская популяция × <i>S. bayanus</i> var. <i>ivarum</i>						
4962 <i>ura4</i> × 7001 <i>lys</i>	22	0	0	0	0	0
4969 <i>ura5</i> × 7001 <i>lys</i>	21	1.2	1	0	0	0
Западнокитайская популяция × <i>S. bayanus</i> var. <i>bayanus</i>						
4962 <i>ura4</i> × 424 <i>ade</i>	36	19.4	8	5	11	4
4962 <i>ura1</i> × 424 <i>ade</i>	16	7.8	1	1	2	1
а) 4969 <i>lys3</i> × 424 <i>ade</i>	20	0	0	0	0	0
б) 4969 <i>lys3</i> × 424 <i>ade</i>	20	3.75	1	0	2	0
4969 <i>lys</i> × 1948 <i>ura</i>	30	0	0	0	0	0
Западнокитайская популяция × Новозеландская популяция						
4962 <i>ura4</i> × 6869 <i>lys1</i>	16	0	0	0	0	0
а) 4962 <i>ura4</i> × 6869 <i>lys1</i>	18	2.8	1	0	1	0
б) 4962 <i>ura4</i> × 6869 <i>lys1</i>	16	3.1	0	0	2	0
4969 <i>lys3</i> × 6867 <i>ura</i>	28	0	0	0	0	0
4971 <i>lys6</i> × 6867 <i>ura</i>	17	0	0	0	0	0

В межпопуляционных скрещиваниях новозеландских штаммов с другими представителями комплекса *S. bayanus* также наблюдалась пониженная фертильность гибридов: 6.2–23.3% с *S. bayanus* var. *ivarum*,

18.6–19% с *S. bayanus* var. *bayanus*, 19.5% с *S. eubayanus*. Межпопуляционные гибриды западнокитайских штаммов с другими популяциями имели пониженную или нулевую выживаемость гибридных аскоспор: 19.4–24.2% с *S. eubayanus*, 0–1.2% с *S. bayanus* var. *ivarum*, 0–19.4% с *S. bayanus* var. *bayanus*, 0–3.1% с новозеландской популяцией. Однако, несмотря на полустерильность межпопуляционных гибридов, во всех гибридных комбинациях наблюдалась рекомбинация родительских маркеров (табл. 4).

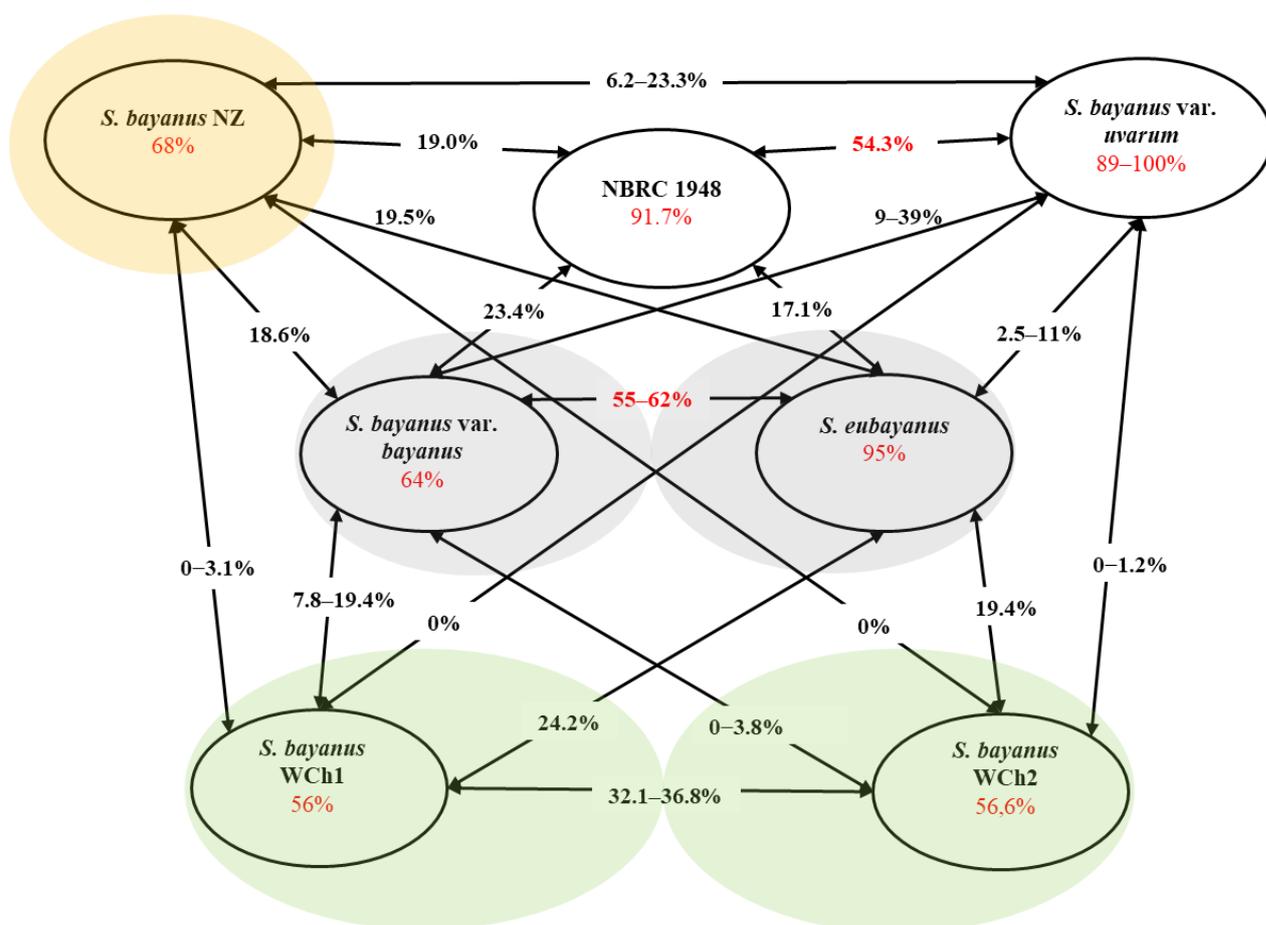


Рисунок 25. Суммарные результаты гибридологического анализа генетических популяций комплекса *Saccharomyces bayanus*

Мы суммировали результаты гибридологического анализа генетических популяций комплекса *S. bayanus*, полученные в настоящей работе, и ранее опубликованные данные (Наумов, 2000, 2017; Наумов и др., 2003, Naumov et al., 2000; Naumova et al., 2005). По выживаемости гибридных аскоспор изученные популяции можно разделить на 4 группы (рис. 25). Выживаемость аскоспор гибридов *S. bayanus* var. *bayanus* × *S. eubayanus*

составила 55–62%, что сопоставимо с фертильностью гибридов при скрещивании разных штаммов *S. bayanus* var. *bayanus* с выживаемостью 64%. Новозеландские штаммы образовывали низко фертильные гибриды со всеми генетическими популяциями: 6.2–23.3%. Практически стерильные или низко фертильные гибриды со всеми популяциями образовывали западнокитайские штаммы: выживаемость аскоспор составила 0–24.2%. Низкую выживаемость аскоспор также имели гибриды *S. bayanus* var. *ivarum* с *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. eubayanus*: 9–39 и 2.5–11% соответственно (рис. 25). Исключением является достаточно фертильный гибрид CBS 7001 × NBRC 1948, который произвел 54.5% выживших аскоспор. Следует отметить, что гибриды штамма NBRC 1948 со штаммами новозеландской популяции, *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. eubayanus* характеризовались низкой выживаемостью аскоспор: 17.1–23.4% (рис. 25).

6.6. Обсуждение

С помощью мультигенного филогенетического анализа, молекулярного кариотипирования и гибридологического анализа установлено сложное строение комплекса *S. bayanus*, который включает, по крайней мере, пять генетических популяций: *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *ivarum*, *S. eubayanus*, новозеландская и западнокитайская популяции. Следует отметить гетерогенность последней популяции, дифференцированной на две субпопуляции – WCh1 (4962, 4965) и WCh2 (4969, 4971 и 4940). Штаммы WCh1 не отличались по *AluI*-профилю от дрожжей *S. bayanus* var. *ivarum*, тогда как штаммы WCh2 имели уникальный рестрикционный профиль. В отличие от остальных изученных штаммов, западнокитайские обладают псевдогенами (*mel1⁰* и *mel2⁰*) и не способны ферментировать мелибиозу.

Характерная для *S. bayanus* var. *ivarum* реципрокная транслокация, затрагивающая хромосомы VI и X, отсутствует у штаммов *S. eubayanus*, западнокитайской и новозеландской популяций, но имеется у некоторых штаммов *S. bayanus* var. *bayanus*, выделенных из источников пивоварения.

ГЛАВА 7. α -ГЛЮКОЗИДАЗЫ MAL И IMA ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES*

7.1. Филогенетическое происхождение α -глюкозидаз MAL и IMA генетической линии *S. cerevisiae* S288C

У различных штаммов *S. cerevisiae* в разном количестве и комбинациях ранее идентифицировано пять мальтозных генов: *MAL12*, *MAL22*, *MAL32*, *MAL42* и *MAL62* (Needleman et al., 1984). В геноме генетической линии *S. cerevisiae* S288C имеется два мальтозных гена *MAL12* и *MAL32*, а также обнаружено новое близкородственное семейство изомальтозных генов *IMA1–IMA5* (Наумов, Наумов, 2010; Brown et al., 2010; Teste et al., 2010).

Для установления происхождения α -глюкозидаз IMA и MAL дрожжей *S. cerevisiae* S288C нами был проведен поиск гомологичных последовательностей α -глюкозидаз (мальтаз и изомальтаз) у филогенетически наиболее родственных родов дрожжей в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Принимая во внимание концепцию полной дупликации генома (ПДГ) у дрожжей рода *Saccharomyces*, в сравнительный анализ были включены множественные α -глюкозидазы MAL и IMA протоплоидных (геномы которых не прошли дупликации) дрожжей родов *Kluveromyces* и *Lachancea* (Приложение, Таблица П6).

Поиск гомологичных последовательностей α -глюкозидаз (мальтаз и изомальтаз) у изученных видов дрожжей проводили в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) с помощью программы BLAST. В качестве запроса использовали полную аминокислотную последовательность мальтазы MAL12 длиной 589 а.о. генетической линии дрожжей *S. cerevisiae* S288C (регистрационный номер в GenBank YGR292W). Неполные последовательности белков в филогенетическом анализе не использовали. Дифференциацию мальтаз и изомальтаз проводили по субстрат-специфичным диагностическим сайтам: для изомальтаз характерен

трипептид Val216-Gly-Ser, а для мальтаз – Thr-Ala-Gly (Teste et al., 2010; Наумов, Наумов, 2010; Yamamoto et al., 2004). Значимость остатка Val216 для субстратной специфичности дрожжевой изомальтазы была ранее подтверждена с помощью сайт-направленного мутагенеза (Yamamoto et al., 2004).

Для установления происхождения α -глюкозидаз IMA и MAL был проведен сравнительный филогенетический анализ. Были использованы последовательности мальтаз MAL12, MAL32 и изомальтаз IMA1–IMA5 генетической линии *S. cerevisiae* S288C, а также α -глюкозидазы их ближайших и дальних родственников. Диагностические сайты Val216-Gly-Ser и Thr-Ala-Gly позволили дифференцировать изомальтазы и мальтазы у всех изученных дрожжей, кроме дивергентных мальтаз, которые представлены у дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* и *Debaryomyces hansenii*. Следует отметить, что для IMA5 *S. cerevisiae* S288C характерным диагностическим сайтом является трипептид Val211-Gly-Ser.

На рисунке 26 представлено построенное нами филогенетическое древо родства видов дрожжей на основе аминокислотных последовательностей α -глюкозидаз MAL и IMA. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей α -глюкозидаз продемонстрировал наличие нескольких изолированных кластеров (рис. 26). Отдельное положение на древе занимают мальтазы представителей неблизкородственных *S. cerevisiae* родов дрожжей: *Schi. pombe*, *D. hansenii* и *Scheffersomyces stipitis*. Обратим внимание, что *D. hansenii* обладает двумя дивергентными мальтазами с 46% сходством между ними. Уровень сходства аминокислотных последовательностей мальтазы штамма ДЕНА2А13882р с мальтазами дрожжей *Schef. stipitis* составляет 70–72%, тогда как мальтаза ДЕНА2Е00528р более сходна с мальтазой филогенетически неродственных дрожжей *Schi. pombe*. α -Глюкозидазы *S. cerevisiae*, *Kluveromyces lactis*, *Kluveromyces dobzhanskii* и десяти видов *Lachancea* образовали отдельный кластер со 100%-ной бутстреп-поддержкой.

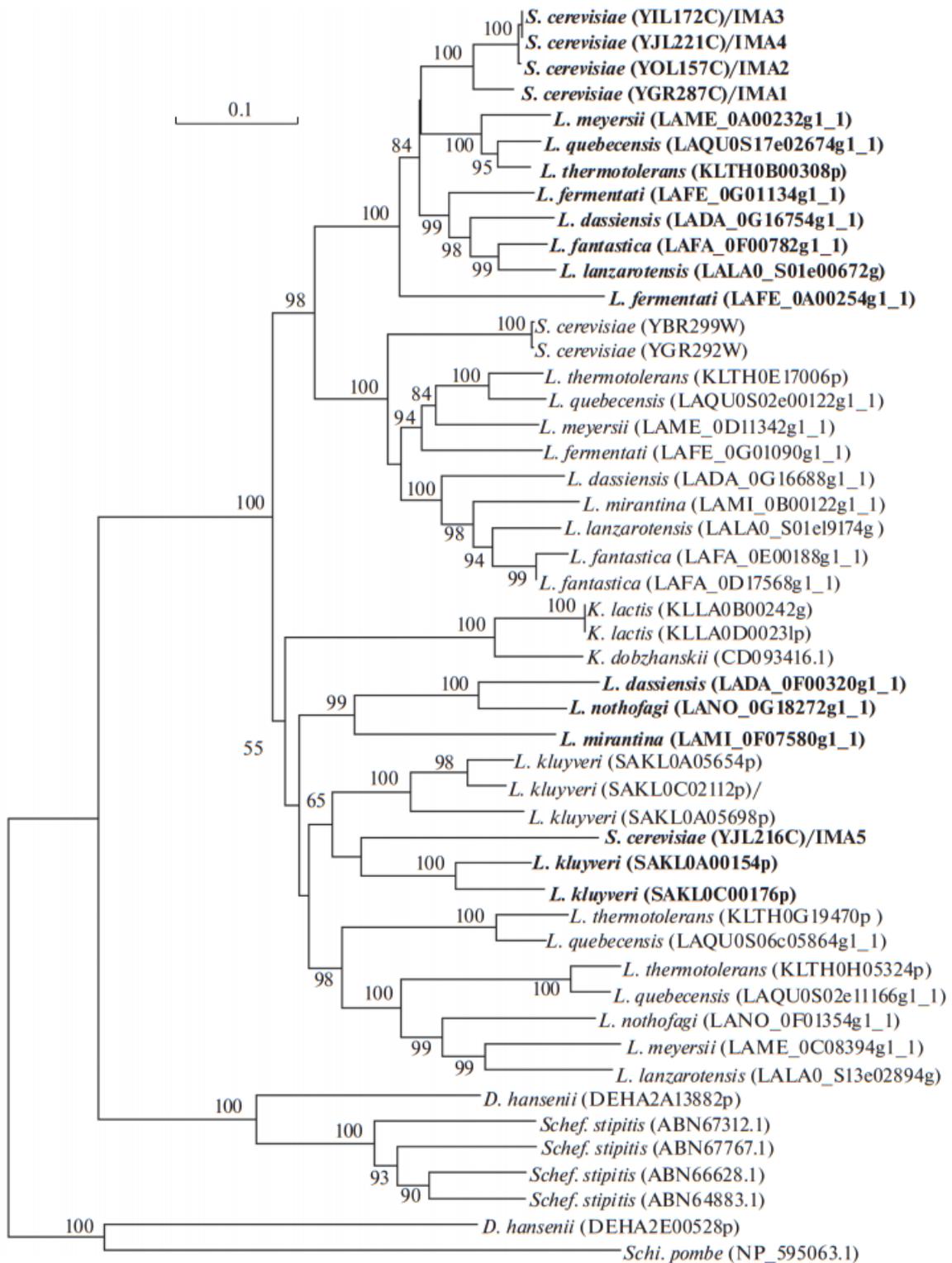


Рисунок 26. Филогенетическое дерево сходства α -глюкозидаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* S288C и родственных им видов родов *Lachancea* (*L.*) и *Kluyveromyces* (*K.*). Приводятся значения бутстрепа не менее 50%. Шкала соответствует 100 заменам на 1000 аминокислотных остатков. В скобках указан регистрационный номер α -глюкозидаз в GenBank. Изомальтазы, в отличие от мальтаз, помечены жирным шрифтом. В качестве внешней группы использованы последовательности мальтаз дрожжей *Debaryomyces hansenii*, *Schizosaccharomyces pombe* и *Scheffersomyces stipitis*.

Среди α -глюкозидаз этих дрожжей выделяется хорошо обособленный кластер (бутстреп 98%), который включает два субкластера также с высокой статистической поддержкой (100%). Первый объединяет изомальтазы IMA1–IMA4 дрожжей *S. cerevisiae* S288C и изомальтазы *L. dasiensis*, *L. fantastica*, *L. fermentati*, *L. lanzarotensis*, *L. meyersii*, *L. quebecensis*, *L. thermotolerans*, уровень сходства аминокислотных последовательностей которых составляет 75–100%. Во втором субкластере объединились мальтазы MAL вышеперечисленных 7 видов и *L. mirantina*, идентичность которых составила 75–99%. Сходство между изомальтазами и мальтазами у этих видов оказалась ниже – 68–72%.

В гетерогенной группе (бутстреп 55%), наряду с мальтазами MAL и изомальтазами IMA дрожжей *K. lactis*, *K. dobzhanskii*, *L. dasiensis*, *L. kluyveri*, *L. lanzarotensis*, *L. meyersii*, *L. mirantina*, *L. nothofagi*, *L. quebecensis* и *L. thermotolerans*, находится изомальтаза IMA5 дрожжей *S. cerevisiae* S288C с характерным диагностическим сайтом Val211-Gly-Ser. В целом, уровень идентичности входящих в эту гетерогенную группу α -глюкозидаз значительно ниже, чем в первом кластере (57–88%). Наибольшее сходство имеют изомальтазы (SAKL0A00154p, SAKL0C00176p) и мальтазы (SAKL0A05698p, SAKL0A05698p и SAKL0C02112p) дрожжей *L. kluyveri*: 88 и 73–79% соответственно. Сопоставимый уровень сходства имеет также изомальтаза IMA5 *S. cerevisiae* и две изомальтазы *L. kluyveri*: 70–72%. Наиболее дивергентными оказались изомальтазы LADA_0F00320g1_1 дрожжей *L. dasiensis*, *L. nothofagi* (LANO_0G18272g1_1) и *L. mirantina* (LAMI_0F07580g1_1), аминокислотные последовательности которых идентичны на 73–83%, а уровень сходства с остальными α -глюкозидазами этого кластера составляет 57–64%. Следует отметить, что у первых двух изомальтаз в диагностическом триplete Val216-Gly-Ser произошла замена аминокислот Ser на Gly и изменилось положение кодона: Val145-Gly-Gly и Val219-Gly-Gly, тогда как у LAMI_0F07580g1_1 произошла замена Gly на Ala и изменение положения сайта: Val223-Ala-Gly. Для изомальтаз *L. kluyveri*

SAKL0A00154p и SAKL0C00176p диагностический сайт был без изменений: Val216-Gly-Ser. Также отмечено, что все обнаруженные α -глюкозидазы *L. fantastica* попали в первый кластер, тогда как α -глюкозидазы *L. kluyveri*, *L. nothofagi*, *K. lactis* и *K. dobzhanskii* обнаружены только во втором кластере. α -Глюкозидазы остальных восьми изученных видов *Lachancea* распределились между двумя кластерами.

7.2. α -Глюкозидазы MAL и IMA видов рода *Saccharomyces*

С помощью программы BLAST был проведен поиск дивергентной последовательности α -глюкозидазы IMA5 у 7 видов рода *Saccharomyces*: *S. arboricola* CBS 10644, *S. cariocanus* UFRJ 50816, *S. paradoxus* CBS 432, *S. mikatae* NBRC 1815, *S. bayanus* CBS 7001, *S. jurei* CBS 14759 и *S. kudriavzevii* SR85. Дифференциацию мальтаз и изомальтаз также проводили по диагностическим сайтам: Val211-Gly-Ser для IMA5 и Thr-Ala-Gly для MAL.

У всех видов *Saccharomyces*, за исключением *S. bayanus* CBS 7001, обнаружена дивергентная изомальтаза IMA5. В геноме *S. bayanus* CBS 7001 имеются пять последовательностей с диагностическим сайтом Val216-Gly-Ser с уровнем сходства 96–99%. В то же время, дивергентная IMA5 *S. cerevisiae* S288C имеет лишь 60–66% идентичности с IMA1–IMA4 этого штамма (Наумов, Наумов, 2010). С IMA1–IMA4 штамма *S. cerevisiae* S288C обнаруженные изомальтазы *S. bayanus* сходны на 91.7–93%. α -Глюкозидазы MAL (диагностический сайт Thr-Ala-Gly) не обнаружены только у *S. arboricola*. Для дрожжей *S. paradoxus* и *S. cariocanus* характерно наличие одной мальтазы. Также, как и *S. cerevisiae* S288C, двумя мальтазами MAL обладают *S. bayanus*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae*. Уровень сходства двух мальтаз *S. kudriavzevii* составил 90.6%, а α -глюкозидазы MAL остальных четырех видов идентичны на 96.6–99.8%.

На рисунке 27 представлено филогенетическое древо сходства аминокислотных последовательностей α -глюкозидаз MAL и IMA5 восьми видов дрожжей рода *Saccharomyces*, а также протоплоидных дрожжей

Lachancea и *Kluuveromyces*. С 98%-ной статистической поддержкой на древе выделяется обособленный кластер, включающий два субкластера (бутстреп 100%). В свою очередь, первый субкластер включает две группы; одна из них объединяет мальтазы MAL дрожжей *Saccharomyces*, сходство которых составляет 85–96.6% с высокой поддержкой (бутстреп 100%). Наибольшее сходство имеют мальтазы *S. cerevisiae/S. paradoxus/S. cariocanus* и *S. jurei/S. mikatae*: 91.4–92.6 и 94.7–96.6% соответственно. Наиболее дивергентными являются мальтазы *S. bayanus* и *S. kudriavzevii*, идентичные на 85–86.7%. Сходство с мальтазами остальных видов *Saccharomyces* не превышало 87%. Во второй группе, с более низкой поддержкой (77%), объединились мальтазы 8 видов *Lachancea*. Во второй субкластер вошли изомальтазы IMA1–IMA4 *S. cerevisiae* S288C и изомальтазы *L. dasiensis*, *L. fantastica*, *L. fermentati*, *L. lanzarotensis*, *L. meyersii*, *L. quebecensis* и *L. thermotolerans*.

Второй кластер представлен мальтазами 6 видов *Lachancea*: *L. kluyveri*, *L. quebecensis*, *L. thermotolerans*, *L. nothofagi*, *L. meyersii*, *L. lanzarotensis*, которые идентичны на 64.5–93.7%. К ним примыкают идентичные на 86.8–100% мальтазы *K. lactis* (KLLA0D00231p; KLLA0_B00242g) и *K. dobzhanskii* (CDO93416.1). Межвидовое сходство мальтаз этого кластера составило 58.1–93%.

В третьем кластере (бутстреп 74%) объединились изомальтазы четырех видов *Lachancea* (*L. dassiensis*, *L. nothofagi*, *L. mirantina*, *L. kluyveri*) и дивергентные изомальтазы IMA5 дрожжей *Saccharomyces*, которые со 100%-ной достоверностью объединены в отдельный подкластер. Уровень сходства белков IMA5 дрожжей *S. cerevisiae*, *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* составляет 86.8–99.2%. У *S. cariocanus* и *S. jurei* обнаружено по две изомальтазы IMA5, идентичные на 96.4 и 99.8% соответственно. У остальных 5 видов обнаружено по одной изомальтазе IMA5. Наиболее дивергентными оказались IMA5 *S. kudriavzevii* и *S. arboricola*: 87.6%. Наибольшее сходство имеют изомальтазы *S. jurei* и *S. mikatae*: 99–99.2%. Сходство IMA5 *S. paradoxus* и *S. cariocanus*: 96.4–96.6%.

Внутривидовое сходство α -глюкозидаз IMA5 и MAL было довольно низким и составило у *S. cerevisiae* (60.8–61.1%), *S. mikatae* (62.1–62.3%), *S. jurei* (60.4%), *S. paradoxus* (60.1%), *S. cariocanus* (60.1–60.2%), *S. kudriavzevii* (58.3–59.7%). Для всех IMA5 дрожжей *Saccharomyces* было характерно наличие диагностического сайта Val211-Gly-Ser. Сходство изомальтаз IMA5 видов *Saccharomyces* и дивергентных α -глюкозидаз протоплоидных дрожжей *Lachancea* не превышало 73.5%.

7.3. Обсуждение

Известно, что виды разных родов не могут скрещиваться, а их геномы рекомбинировать. Обнаружение близкородственных α -глюкозидаз у представителей разных родов дрожжей можно объяснить только общим происхождением соответствующих родов. Топология филогенетического дерева, построенного на основании аминокислотных последовательностей α -глюкозидаз дрожжей *Saccharomyces*, чей геном подвергся полной дупликации (ПДГ), и близкородственных дрожжей *Lachancea* и *Kluveromyces*, указывают на происхождение этих видов от общего протоплоидного предка. Отсутствие дивергентной изомальтазы IMA5 у дрожжей вида *S. bayanus* может быть связано со значительной дивергенцией этой последовательности или элиминацией в ходе эволюции.

ГЛАВА 8. ПРИРОДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ПЕКТИНАЗНЫХ ГЕНОВ *PGU* ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES*

Традиционно используемые в виноделии дрожжи *S. cerevisiae*, как правило, не обладают пектинолитической активностью (Fernández-González et al., 2004; Divol, Rensburg, 2007; Louw et al., 2010). Высокая пектинолитическая активность была обнаружена у французского шампанского штамма SCPP (Gainvors et al., 1994; Gognies et al., 1999), который, согласно гибридологическому и кариотипическому анализам, относится к виду *S. bayanus* (Naumov et al., 2001a). На материале ограниченного количества штаммов было показано наличие одного гена *PGU* у дрожжей *S. cerevisiae* и трех полимерных генов (*PGU1b*, *PGU2b* и *PGU3b*) у *S. bayanus* (Fernández-González et al., 2004; Наумов и др., 2016a, 2016b; Наумова и др., 2019). Пектинолитическая активность и гены *PGU* остальных видов *Saccharomyces* ранее не изучались. Исключением является выделенный с виноградников в Хорватии штамм *S. paradoxus* RO88, у которого обнаружена высокая пектинолитическая активность (Redžerović et al., 2003; Eschstruth, Divol, 2011). Показано, что этот штамм обладает и другими важными для виноделия характеристиками.

Нами был проведен скрининг на наличие пектинолитической активности у 541 штамма *Saccharomyces*, выделенных из различных источников: виноделие, почва, сокотечения растений, отходы оливкового производства и другие. В зависимости от диаметра зоны гидролиза на РГ-среде, каждый из исследованных штаммов был отнесён к одной из 6 групп активности: 1) 0–5мм, 2) 5–10мм, 3) 10–15мм, 4) 15–20мм, 5) 20–25мм, 6) >25мм. С помощью молекулярных методов (ПЦР-анализа и Саузерн-гибридизации) была определена копияность и хромосомная локализация пектиназных генов *PGU* у дрожжей рода *Saccharomyces*, а также проведён филогенетический анализ эндо-полигалактуроназ.

8.1. Вид *Saccharomyces cerevisiae*

306 штаммов различного происхождения было проверено на наличие пектинолитической активности (Приложение, Таблица ПЗ, рис. 28), в результате чего штаммы разделились на 6 групп в зависимости от диаметра зоны гидролиза. Большинство исследованных штаммов *S. cerevisiae* (249) совсем не имели активности на PG-среде. Во вторую группу (диаметр зоны гидролиза 5–10мм) вошло 3 штамма, в третью (10–15мм) – 15 штаммов, в четвертую (15–20мм) – 22 штамма, в пятую (20–25мм) – 14 штаммов, в шестую (более 25мм) – 3 штамма (Приложение, Таблица ПЗ). Большинство не имеющих активности штаммов выделены из альпехина (отходы оливкового производства), природных источников; и только несколько штаммов выделены в условиях виноделия.

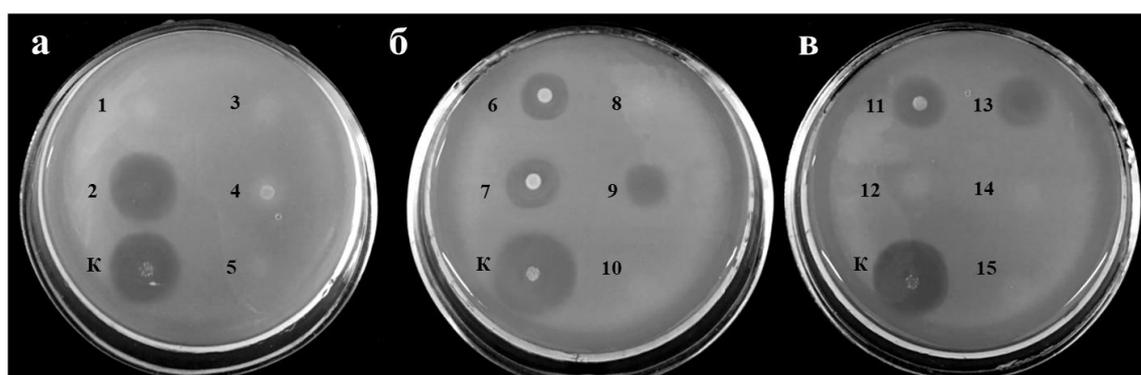


Рисунок 28. Скрининг штаммов *S. cerevisiae* на наличие пектинолитической активности на PG-среде: (а): 1 – Ksc2-2B; 2 – Dji2-2B; 3 – Харьковская 39-5C; 4 – Харьковская 39-5B; 5 – Dji2-2A; (б): 6 – IGC 4591-4B; 7 – IGC 4591-4D; 8 – IGC 4541-3A; 9 – ВКМ Y-1553-3A; 10 – IGC 4546-2A; (в): 11 – IGC 4591-4B-2B; 12 – IGC 4593-1B; 13 – ВКМ Y-1554-2A; 14 – IGC 4544-2C; 15 – IGC 4586-4B. К – Контрольный штамм *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718.

Остальные 5 групп представлены, в основном, винными штаммами, а также единичными природными изолятами. Высокую пектинолитическую активность имели два штамма, выделенные из сокотечения пальмы в Малайзии: UWO-PS 03-459-1-4D (23мм), UWO-PS 03-461-1-8B (23мм), а также штамм DJi2-2B(α) (23.8мм), выделенный из пальмового вина в Джибутти (рис. 28а). Наивысшую активность среди дрожжей *S. cerevisiae* имели три винных штамма: штамм T8-12B – зона гидролиза 26.8мм, штамм I-

421 – 25.3мм и штамм I-438 – 26.4мм. Первый выделен из бродящего сусла в Таджикистане, два другие – из спонтанно сброженного сусла в Ужгороде и Закарпатье (Украина).

На основании ПЦР-анализа штаммы первой группы разделились на две подгруппы. У 230 штаммов, не имеющих активности на среде, прошла ПЦР-амплификация. У ряда этих штаммов было проведено секвенирование амплифицированных генов *PGUI*. У некоторых штаммов выявлены стоп-кодоны, тогда как *PGUI*-последовательности остальных не имели стоп-кодонов. Отсутствие пектинолитической активности у этих штаммов может быть связано с мутациями в регуляторных генах. ПЦР-анализ показал, что у 19 изученных штаммов гены *PGUI* полностью отсутствовали.

8.2. Вид *Saccharomyces bayanus*

В отличие от *S. cerevisiae*, 99 протестированных штаммов комплекса *S. bayanus* в той или иной степени обладали пектинолитической активностью (Приложение, Таблица П2, рис. 29). Семь штаммов *S. bayanus* var. *bayanus* распределились между тремя группами: пять штаммов вошли в третью группу, по одному в четвертую и пятую. Наивысшей активностью обладал выделенный из пива штамм CBS 378 (23.7мм) (рис. 29а).

Среди 68 изученных штаммов *S. bayanus* var. *ivarum* были обнаружены представители 5 групп. Выделенный из бродящей мезги во Франции штамм PJS 1.94 не имел активности на PG-среде. Во вторую группу вошли 2 штамма. Большинство штаммов *S. bayanus* var. *ivarum* разделилось по активности между 3 и 4 группами: 35 и 26 штаммов соответственно (рис. 29а, б). В основном, эти группы представлены винными штаммами. Наивысшей активностью (5 группа) обладали 4 штамма: CBS 431 (23.7), M472-2A (20.7), CBS 8711 (20.1), NCAIM Y.000676-3-4 (23.8) (рис. 29а).

Четырнадцать изученных штаммов *S. eubayanus* в равном количестве разделились между тремя группами: 3) с диаметром зоны гидролиза 10–15мм (5 штаммов), 4) 15–20мм (5 штаммов), 5) 20–25мм (4 штамма). Пятая группа

была представлена тибетскими штаммами *S. eubayanus* (рис. 29б, в). Европейский штамм в опыте на PG-среде не участвовал.

Пять новозеландских штаммов разделились на 2 группы: штаммы РУСС 6864 и РУСС 6868 вошли в 3 группу (10–15мм), остальные три – в 4 группу (15–20мм) (рис. 29б). Штаммы дивергентной западнокитайской популяции вошли в 3, 4 и 5 группы (рис. 29в). Наивысшей активностью обладал штамм 4960, выделенный из гнилого дерева (22.3мм).

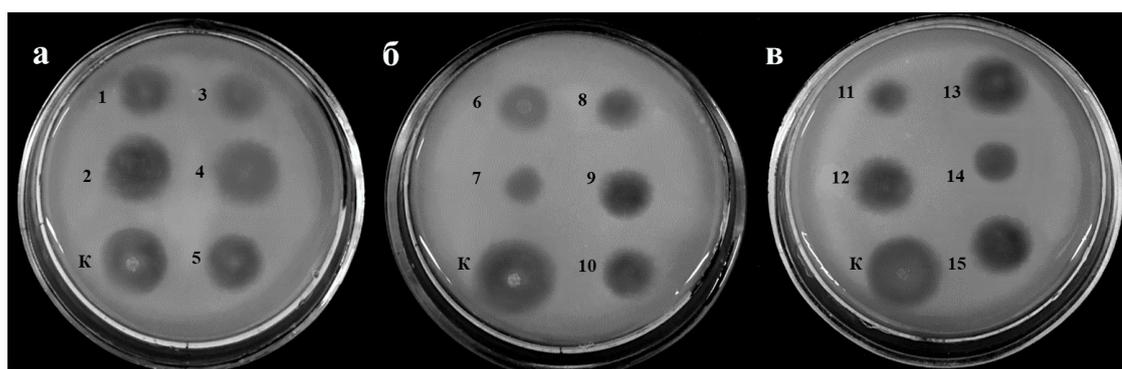


Рисунок 29. Скрининг штаммов *S. bayanus* на наличие пектинолитической активности на PG-среде: (а): *S. bayanus* var. *bayanus*: 1 – CBS 380; 2 – CBS 378; *S. bayanus* var. *ivarum*: 3 – CBS 7001; 4 – CBS 431; 5 – M489-10A; (б): 6 – РУСС 7083; 7 – UWO(PS)99-808-3-5D; *S. bayanus* NZ: 8 – РУСС 6864; 9 – РУСС 6867; *S. eubayanus*: 10 – CBS 12357; (в): 11 – РУСС 7089; 12 – 4948; 13 – 4947; *S. bayanus* WCh: 14 – 4962; 15 – 4965. К – Контрольный штамм *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718.

8.3. Вид *Saccharomyces paradoxus*

Пектинолитическая активность была определена у 100 штаммов *S. paradoxus*, относящихся к четырем географическим популяциям: европейской, дальневосточной, североамериканской и гавайской (Приложение, Таблица П4, рис. 30). В анализ на PG-среде не вошли 29 штаммов: 28 китайских штаммов и штамм RO88, выделенный из винограда в Хорватии. Однако, последовательности генов *PGU* указанных штаммов, имеющиеся в базе GenBank, были использованы в филогенетическом анализе.

Почти все изученные штаммы в той или иной степени были способны секретировать активную эндо-полигалактуроназу (Приложение, Таблица П4, рис. 30). В зависимости от диаметра зоны гидролиза на PG-среде, штаммы

также были разделены на группы: 1) 0–5мм, 2) 5–10мм, 3) 10–15мм, 4) 15–20мм, 5) 20–25мм, 6) >25мм.

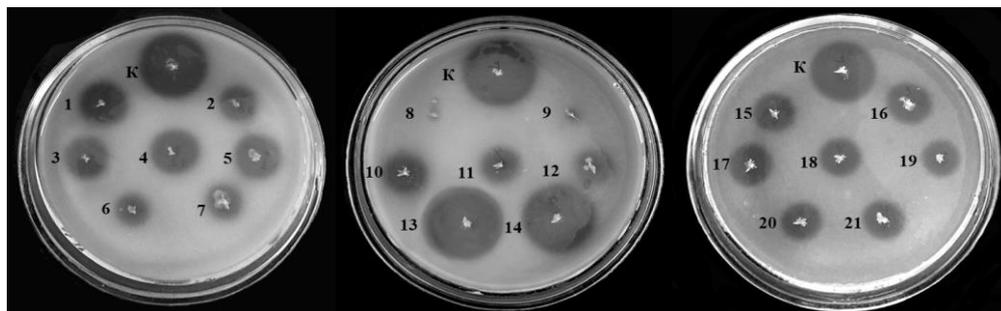


Рисунок 30. Скрининг штаммов *S. paradoxus* на наличие пектинолитической активности на PG-среде: (а): 1 – N20; 2 – N29; 3 – N35; 4 – ZP 506; 5 – N9; 6 – N14; 7 – N26; (б): 8 – ATCC 96968; 9 – UCDFST 71-101; 10 – UCDFST 73-538.2; 11 – UCDFST 72-145; 12 – UCDFST 67-570; 13 – UCDFST 62-186; 14 – UCDFST 61-220; (в): 15 – M2; 16 – M6; 17 – M7 ; 18 – M10; 19 – N43; 20 – 61.02; 21 – N48. К – Контрольный штамм *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718.

По пектинолитической активности 57 штаммов европейской популяции *S. paradoxus* разделились на две практически равные группы. К первой группе (диаметр зоны лизиса 10–15мм) были отнесены 27 штаммов, преимущественно выделенных из сокотечений дуба *Quercus robur* (рис. 30а, в). Среди 28 штаммов второй группы (d=15–20мм) большинство изолировано с зеленой хвои ели, зеленых листьев брусники и сокотечений широколиственных деревьев в европейской части России (Naumov, 1987; Глушакова и др., 2007). Штаммы ATCC 96968 и ATCC 96971, выделенные из экссудата *Quercus* sp. в Финляндии, не имели активности и были отнесены к 1 группе (рис. 30б). Тринадцать штаммов дальневосточной популяции попали в третью группу (d=10–15мм) (рис. 30б, в). К четвертой группе были отнесены выделенные на Дальнем Востоке России штаммы N45, N47 (сокотечение *Q. mongolica*) и ВКМ Y-1697 (сок амурского винограда), а также японский штамм NBRC 1805. Из 18 штаммов североамериканской популяции шесть (95-1, 95-4, 95-7, UCDFST 79-128, UCDFST 79-140 и UCDFST 61-196) характеризовались диаметром зоны гидролиза менее 15мм, и были отнесены к 3 группе (d=10–15мм). Штаммы UCDFST 69-1006, UCDFST 61-248, UCDFST 51-186, UCDFST 51-137, UCDFST 52-153, UCDFST 61-232, UCDFST 72-129 попали в четвертую группу (d=15–20мм).

Три штамма были отнесены к пятой группе: штамм 95-3 (зона просветления 22.9мм), штамм UCDFST 52-225 (20.2мм), штамм UCDFST 61-359 (22.4мм). Два штамма имели зону гидролиза полигалактуроновой кислоты более 25мм: UCDFST 61-220 (25.4мм) и UCDFST 62-186 (27.4мм) (рис. 30б). Следует отметить, что пектинолитическая активность последнего штамма была выше, чем у контрольного штамма ВКПМ Y-718 (27.0мм). Обладающий наибольшей пектинолитической активностью штамм UCDFST 62-186 выделен из осинового гнезда в Канаде. Среди 7 изученных гавайских штаммов только два имели активность: штамм UCDFST 72-145 (13.8мм) и идентифицированный нами как гибридный штамм UCDFST 73-538.2 (14.6мм). У штаммов UCDFST 72-149, UWO(PS) 91-917.1, UCDFST 72-140, UCDFST 71-101 и UCDFST 72-143 активность не обнаружена (Приложение, Таблица П4, рис. 30б).

8.4. Виды *Saccharomyces arboricola*, *S. cariocanus*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae*

Все изученные штаммы дрожжей *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae* имели невысокую активность (зона гидролиза не превышала 15мм) и попали в первые три группы (Приложение, Таблица П1, П5, рис. 31).

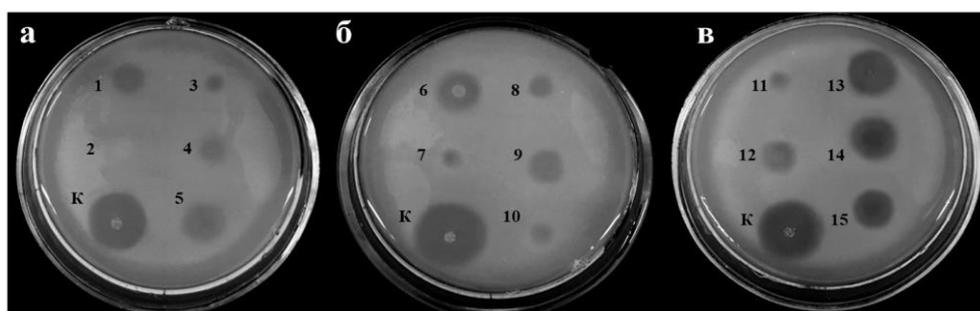


Рисунок 31. Скрининг штаммов *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. jurei* на наличие пектинолитической активности на PG-среде: (а): *S. kudriavzevii*: 1 – ES14S09; 2 – NBRC10991; 3 – NBRC 1802; 4 – NBRC 10990; *S. cariocanus*: 5 – UFRJ 50816; (б): 6 – UFRJ 50791; *S. mikatae*: 7 – NBRC 1815; 8 – NBRC 11002; 9 – NBRC 11003; 10 – NBRC 10996; (в): *S. arboricola*: 11 – AS 2.3319; 12 – AS 2.3318; *S. jurei*: 13 – ВКМ Y-3330; 14 – CBS 14759; 15 – NCYC 3962. К – Контрольный штамм *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718.

В настоящее время известно четыре штамма *S. jurei*: два из которых выделены с коры дуба во Франции и один из ясеня в Германии (Naseeb et al., 2017; Hutzler et al., 2021). Четвёртый штамм, выделенный из почвы в Дагестане, идентифицирован в настоящем исследовании. Несмотря на общее происхождение первых двух штаммов, для них была характерна различная пектинолитическая активность: для штамма CBS 14759 – диаметр ореола 17.2мм и штамма NCYC3962 – 14.7мм. Дагестанский штамм имел активность, близкую к активности типовой культуры – 17.3мм (Приложение, Таблица П5, рис. 31в). Немецкий штамм в экспериментах по пектинолитической активности не участвовал.

8.5. Хромосомная локализация генов *PGU* у дрожжей *Saccharomyces*

С помощью пульс-электрофореза нативных хромосомных ДНК и Саузерн-гибридизации была определена хромосомная локализация генов *PGU* у изученных штаммов *Saccharomyces*. Молекулярные кариотипы некоторых штаммов представлены на рисунках 32–34.

На рис. 32б представлены результаты Саузерн-гибридизации хромосомных ДНК дрожжей *S. cerevisiae*, *S. cariocanus*, *S. paradoxus* и *S. kudriavzevii* с зондом *PGU1* штамма *S. cerevisiae* S288C. Все изученные штаммы *S. cerevisiae* (58), *S. cariocanus* (2), *S. paradoxus* (9) и *S. kudriavzevii* (7) обладали только одним пектиназным геном *PGU*, расположенным в районе хромосомы X размером около 770 т.п.н. стандартного штамма YNN 295 (рис. 32а, дорожки 1, 2, 3–11, 12, 13 и 14–20). У трех из 10 изученных штаммов *S. cerevisiae*, не имеющих активности на PG-среде, гибридационные сигналы не были обнаружены: штаммы M435, CBS 7962 и СЕСТ 10484. У остальных семи штаммов гибридационные сигналы выявлены (рисунок не приводится). По-видимому, эти штаммы обладают нефункциональными генами *PGU* из-за мутаций в промоторной области или регуляторных генах. Псевдогенов среди них обнаружено не было.

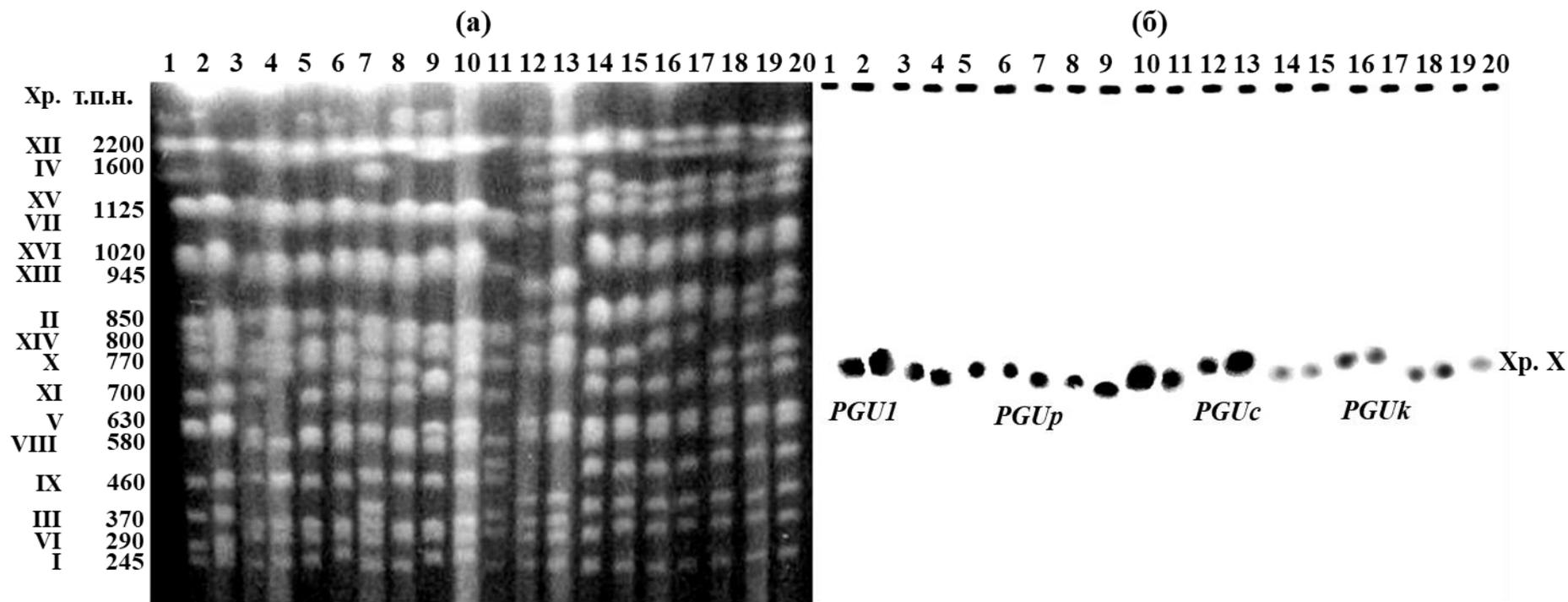


Рисунок 32. Пульс-электрофорез (а) и Саузерн-гибридизация (б) хромосомной ДНК дрожжей *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus* и *S. kudriavzevii* с зондом *PGU1 S. cerevisiae* S288C. *S. cerevisiae* : 1 – YNN 295, 2 – S288C; *S. paradoxus*: 3 – CBS 432, 4 – CBS 5829, 5 – CBS 406, 6 – N17, 7 – N43, 8 – N44, 9 – 95-1, 10 – UCDFST 52-153, 11 – UWO (PS) 91-917.1; *S. cariocanus*: 12 – UFRJ 50816, 13 – UFRJ 50791; *S. kudriavzevii*: 14 – NBRC 1802, 15 – NBRC 1803, 16 – NRRL 63704, 17 – NRRL 63705, 18 – PYCC 5977, 19 – ВКПМ Y-4736, 20 – PYCC 5979. Нумерация и размеры хромосом приводятся согласно стандартному штамму *S. cerevisiae* YNN 295 (дорожка 1).

Известно, что виды *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. kudriavzevii* имеют коллинеарные молекулярные кариотипы (Fisher et al., 2000). Дрожжи *S. cariocanus* имеют видоспецифичный кариотип благодаря наличию четырех реципрокных транслокаций (IX/XV, II/XVI, XI/IV и XII/XIV), которые, однако, не затрагивают хромосому X (рис. 32, дорожки 12 и 13). Таким образом, гены *PGU1p* *S. paradoxus*, *PGU1k* *S. kudriavzevii*, *PGU1c* *S. cariocanus* и *PGU1* *S. cerevisiae* имеют одинаковую локализацию – на хромосоме X. Следует отметить, что интенсивность гибридизационных сигналов у штаммов *S. kudriavzevii* с зондом *PGU1* была значительно слабее, чем у штаммов *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. cariocanus*.

Согласно Саузерн-гибридизации, у дрожжей *S. arboricola* (4 штамма) ген *PGU1a* также расположен в хромосоме X (рис. 33б, дорожки 19–22). У этих дрожжей имеется одна хромосомная транслокация (IV/XIII), также не затрагивающая хромосому X (Liti et al., 2013). У дрожжей *S. mikatae* (14 штаммов) и *S. jurei* (2) выявлено по два гибридизационных сигнала, расположенных в районе хромосом X (~770 т.п.н.) и VIII (~580 т.п.н.) стандартного штамма YNN 295 (рис. 33, дорожки 3–16, 17, 18 и 1, соответственно). Как отмечалось ранее, молекулярные кариотипы дрожжей *S. mikatae* и *S. jurei* характеризуются общей реципрокной транслокацией между хромосомами VI и VII, а у последнего вида имеется дополнительная хромосомная транслокация I/XIII (Наумова и др., 2011; Naseeb et al., 2017; настоящее исследование). Таким образом, хромосомы X и VIII у видов *S. mikatae*, *S. jurei* и *S. cerevisiae* имеют примерно одинаковые размеры.

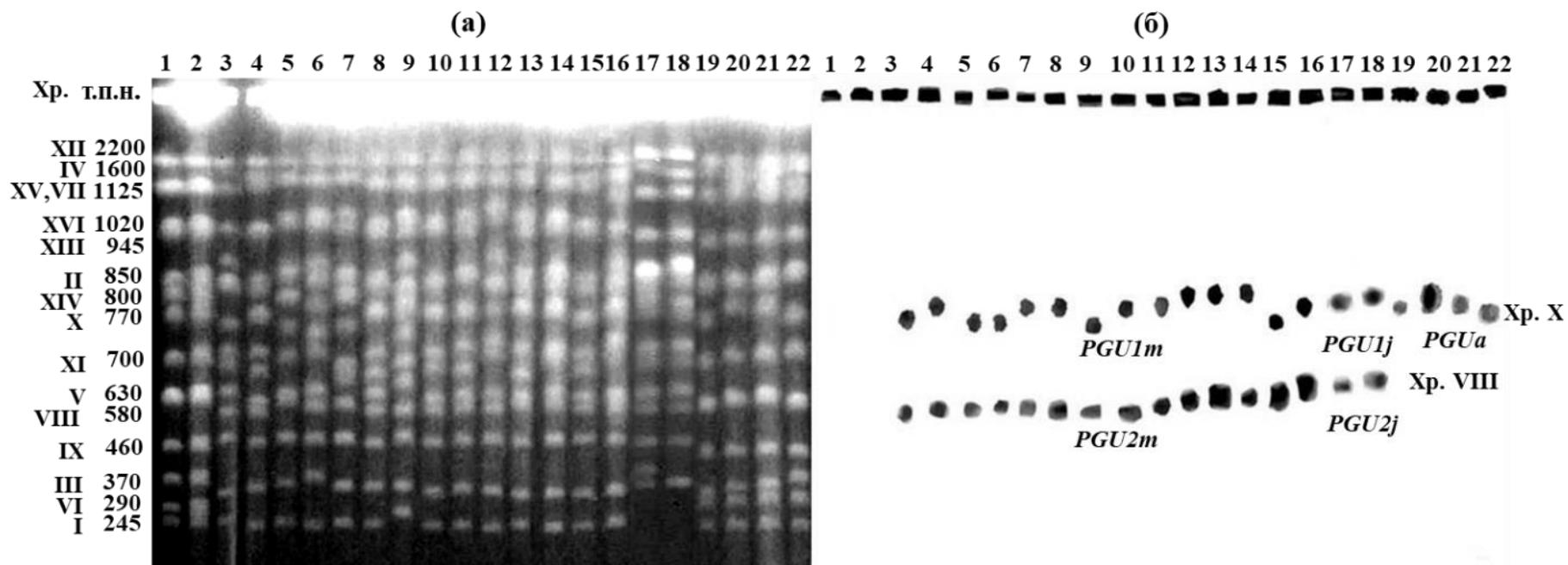


Рисунок 33. Пульс-электрофорез (а) и Саузерн-гибридизация (б) хромосомной ДНК дрожжей *S. mikatae*, *S. jurei* с зондом *PGU1m* NBRC 1815 и *S. arboricola* с зондом *PGU1a* CBS 10644. *S. cerevisiae*: 1 – YNN 295, 2 – S288C; *S. mikatae*: 3 – NBRC 1815, 4 – NBRC 1816, 5 – NBRC 10992, 6 – NBRC 10993, 7 – NBRC 10994, 8 – NBRC 10995, 9 – NBRC 10996, 10 – NBRC 10997, 11 – NBRC 10998, 12 – NBRC 10999, 13 – NBRC 11000, 14 – NBRC 11001, 15 – NBRC 11002, 16 – NBRC 11003; *S. jurei*: 17 – NCYC 3947, 18 – NCYC 3962; *S. arboricola*: 19 – CBS 10644, 20 – AS 2.3318, 21 – AS 2.3319, 22 – NRRL Y-63703. Нумерация и размеры хромосом приводятся согласно стандартному штамму *S. cerevisiae* YNN 295 (дорожка 1).

На рисунке 34 представлены молекулярные кариотипы и результаты Саузерн-гибридизации дрожжей *S. bayanus*. В качестве зонда использовали ПЦР-амплифицированный ген *PGU1b* штамма CBS 7001. У всех 28 изученных штаммов *S. bayanus* обнаружено по три гибридационных сигнала (рис. 34б, дорожки 2–14). Исключением является ранее изученный винный штамм PJS1.94, у которого имеются только два гена: *PGU1b* и *PGU3b* (Наумова и др., 2019). Сильный гибридационный сигнал отмечен на четвертой снизу (на геле) хромосоме. Дрожжи *S. bayanus* имеют видоспецифичный кариотип за счет трех реципрокных транслокаций, одна из которых между хромосомами X и VI (Fisher et al, 2000; Naumova et al., 2005). Еще два гибридационных сигнала расположены на хромосомных полосах, которые по размеру соответствуют хромосомам I (~245 т.п.н.) и XIV (~800 т.п.н.) стандартного штамма YNN 295 (рис. 34б, дорожка 1). Следует отметить слабую гибридацию зонда *PGU1b* с генами *PGU2b* и *PGU3b*, при этом гибридация с геном *PGU1* дрожжей *S. cerevisiae* YNN 295 полностью отсутствовала (рис. 34б, дорожка 1).

8.6. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей эндо-полигалактуроназ дрожжей комплекса *S. bayanus*

Дрожжи комплекса *S. bayanus* независимо от источника и места выделения имеют генотип *PGU1b PGU2b PGU3b*. Исключением является французский винный штамм *S. bayanus* var. *ivarum* PJS1.94, обладающий только двумя пектиназными генами: *PGU1b* (хромосома X) и *PGU3b* (XIV). Сходство нуклеотидных последовательностей гена *PGU1b* с генами *PGU2b* и *PGU3b* составляет 86–87%, а последние два гена идентичны между собой на 96% (Наумов и др., 2016; Наумова и др., 2019).

Мы провели секвенирование генов *PGU1b*, *PGU2b* и *PGU3b* у 30 штаммов *S. bayanus* различного происхождения и с различной пектинолитической активностью: *S. bayanus* var. *ivarum* (штаммы SC4, SRC258, CBS 8711, TBVIC2.95, PJS2.95, СЕСТ 10560, РУСС 6330, РУСС 7082, РУСС 7083, UWO (PS) 99-808.3, 4976), *S. bayanus* var. *bayanus* (штаммы CBS 380, CBS 378, NBRC 1948), *S. eubayanus* (штаммы РУСС 7084, РУСС 7085, РУСС 7086, РУСС 7087, РУСС 7088, уHKS 210, 4940, 4946, 4947, 4948), *S. bayanus* NZ (штамм РУСС 6867) и *S. bayanus* WCh (штаммы 4960, 4962, 4965, 4969, 4971). Нуклеотидные последовательности генов *PGU1b* 13-ти штаммов *S. bayanus* var. *ivarum* (CBS 7001, CBS 395, CBS 377, M300, ВКМ Y-361, ВКМ Y-1140, NCAIM Y.00677, T5/6, T13/30, PJS1.94, ССY21-31-12, 136.01 и 148.01) и типовой культуры *S. eubayanus* CBS 12357 были взяты из работы Наумова и др., (2019) и базы данных GenBank. Из-за большого сходства нуклеотидных последовательностей генов *PGU2b* и *PGU3b* не представляется возможным провести секвенирование корректно и «прочитать» последовательности этих генов. В этой связи, в анализ были включены только некоторые последовательности генов *PGU2b* и *PGU3b*.

По полученным нуклеотидным последовательностям генов *PGU* были определены аминокислотные последовательности кодируемых ими белков и построено филогенетическое древо (рис. 35). На филогенетическом древе

выделяются два кластера. Первый включает белки Pgu1b изученных штаммов *S. bayanus*. Последовательности Pgu1b дрожжей *S. bayanus* var. *ivarum* разделились на две группы с уровнем сходства 99.2% (3 аминокислотные замены). В первую группу попали 17 штаммов: PJS1.94, UWO(PS) 99–808.3, PJS2.95, M300, CCY21-31-12, PYCC 6330, PYCC 7082, CBS 377, TBVIc2.95, CBS 7001, ВКМ Y-1146, T5/6, ВКМ Y-361, T13/30, 4976, CBS 395 и SC4. Во вторую группу вошли 9 штаммов: 148.01, 136.0, ВКМ Y-508, PYCC 7083, M488, СЕСТ 10560, SRC258, NCAIM Y.00677 и CBS 8711.

По PGU1b-последовательностям штаммы *S. eubayanus* разделились на четыре группы: 98.6–99.7% сходства (различия в 1–5 а.о.). В первую группу вошли штаммы: yHKS210, PYCC 7085, PYCC 7086, PYCC 7087, PYCC 7088, PYCC 7084. Вторую группу сформировали тибетские штаммы. Третья и четвертая группы представлены, соответственно, типовой культурой CBS 12357 и европейским штаммом UCD650. Белки Pgu1b *S. bayanus* var. *ivarum* и *S. eubayanus* имеют 89.4–95% сходства.

Сходство пектиназы Pgu1b дрожжей *S. bayanus* var. *bayanus* составляет 94.4–94.7% с *S. bayanus* var. *ivarum* и 98.6–99.7% с *S. eubayanus*. Белки Pgu1b *S. bayanus* var. *bayanus* и европейского штамма *S. eubayanus* UCD650 идентичны. Эндо-полигалактуроназы Pgu1b новозеландских (PYCC 6867) и западнокитайских (4960) штаммов идентичны на 90.6%. В целом, сходство PGU1b-последовательностей в комплексе *S. bayanus* составило 90.2–100%. Наиболее дивергентным оказался белок Pgu1b новозеландского штамма PYCC 6867, занимающий на филогенетическом древе отдельное положение.

Второй кластер представлен двумя подкластерами. Первый включает белки Pgu2b и Pgu3b дрожжей *S. bayanus* var. *ivarum*, *S. bayanus* NZ PYCC 6867 и *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 378. Отмечена низкая статистическая поддержка данного подкластера. Второй подкластер образован эндо-полигалактуроназами Pgu2b и Pgu3b штаммов *S. eubayanus* и *S. bayanus* WCh 4960. Интересно отметить, что белки Pgu2b и Pgu3b штамма *S. bayanus* var.

bayanus NBRC 1948 попали в разные подкластеры: Pgu2b сгруппирован с белками *S. bayanus* var. *ivarum*, Pgu3b с белками *S. eubayanus*.

Белки Pgu2b и Pgu3b штаммов *S. bayanus* var. *ivarum* идентичны на 96.7–97.5%. Их сходство с белками Pgu1b составило 88.6–90.8% и 90.0–90.5% соответственно. Последовательности Pgu2b и Pgu3b разных штаммов *S. bayanus* var. *ivarum* идентичны на 96.7–100% и 99.4–100% соответственно. Белки Pgu2b и Pgu3b новозеландского штамма РУСС 6867 сходны на 99.2%, а их сходство с Pgu1b составило 96.9% и 97.2%.

Эндо-полигалактуроназы Pgu2b и Pgu3b штамма NBRC 1948, попавшие в разные подкластеры, имеют 96.1% сходства. Белок Pgu2b этого штамма имеет 97–99.7% идентичности с соответствующими белками *S. bayanus* var. *ivarum* и 96.1–97.7% с белками штамма CBS 378.

Белки Pgu2b и Pgu3b штаммов *S. eubayanus* идентичны на 99.7–100%. Их сходство с белками Pgu1b было 89.1–91.4% и 89.1–89.7% соответственно. Сходство эндо-полигалактуроназ Pgu2b и Pgu3b западнокитайского штамма *S. bayanus* WCh 4960 составило 95%, а с Pgu1b, соответственно, 88.5% и 90.8%. В целом, белки Pgu2b и Pgu3b двух подкластеров идентичны на 92.2–98.6% и 96.9–98.3%.

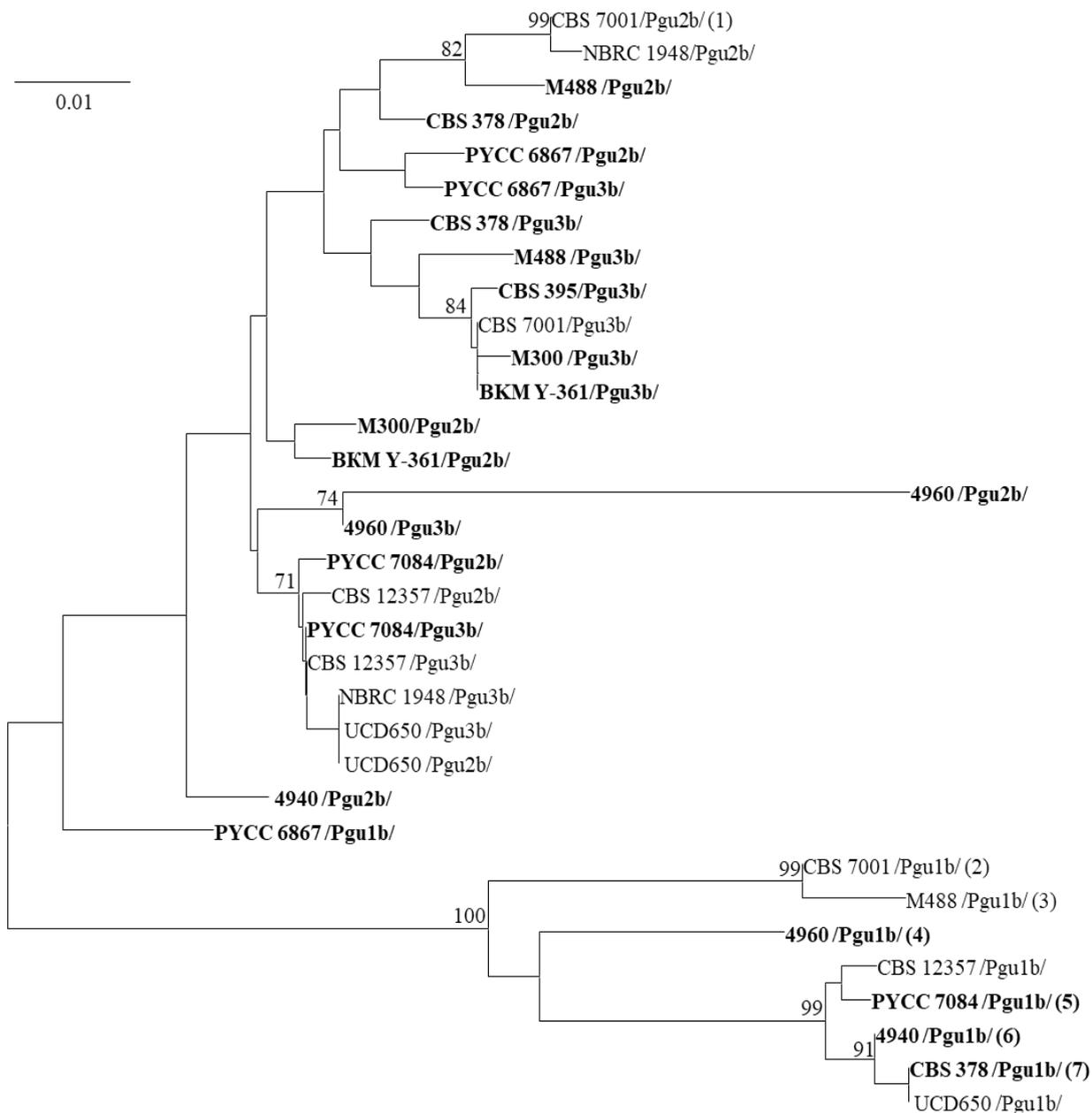


Рисунок 35. Филогенетический анализ сходства аминокислотных последовательностей эндо-полигалактуроназ Pgu дрожжей комплекса *S. bayanus*. Приводятся значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует 10 аминокислотным заменам на 1000 аминокислотных позиций. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов, имеющие идентичные аминокислотные последовательности: (1) – **CBS 395**; (2) – CBS 395, **SC4, PJS1.94, UWO(PS) 99–808.3, PJS2.95**, M300, CCY21-31-12, PYCC 6330, PYCC 7082, CBS 377, **TBVIc2.95**, ВКМ Y-1146, **T5/6**, ВКМ Y-361, **T13/30, 4976**; (3) – 136.01, 148.01, NCAIM Y.00677, ВКМ Y-508, **CBS 8711, СЕСТ 10560, SRC258, PYCC 7083**; (4) – **4962, 4965**; (5) – **yHKS210, PYCC 7085, PYCC 7086, PYCC 7087, PYCC 7088**; (6) – **4946, 4947, 4948**; (7) – CBS 380, **NBRC 1948**. Жирным шрифтом отмечены штаммы, нуклеотидные последовательности которых определены в данной работе.

8.7. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей эндо-полигалактуроназ дрожжей *Saccharomyces*

Мы провели секвенирование генов *PGU1* у 81 штамма *Saccharomyces* разной видовой принадлежности, которые выделены из различных источников и отличаются по пектинолитической активности. Полученные нуклеотидные последовательности сравнили между собой и с *PGU*-последовательностями штаммов *Saccharomyces*, депонированными в базу данных GenBank. Анализируемые нуклеотидные последовательности имели длину 1077 н.п., что покрывает большую часть кодирующей области генов *PGU*. По полученным нуклеотидным последовательностям генов *PGU* дрожжей *Saccharomyces* были определены аминокислотные последовательности соответствующих белков, состоящих из 359 аминокислотных остатков. На основании анализа аминокислотных последовательностей было построено филогенетическое древо (рис. 36). В качестве внешней группы использовали эндо-полигалактуроназу Epg1 дрожжей *Kluyveromyces marxianus*.

Все изученные эндо-полигалактуроназы дрожжей *Saccharomyces* разделились на два основных кластера. Первый кластер включает три подкластера. Внутри первого подкластера с 99%-ной статистической достоверностью объединились эндо-полигалактуроназы *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. cariocanus*. Эндо-полигалактуроназы дрожжей *S. paradoxus* и *S. cariocanus*, которые идентичны между собой на 96.4–100% (рис. 36), образовали отдельную подгруппу. Вторая подгруппа представлена штаммами *S. cerevisiae* (с 95.6–100% сходством). Наиболее дивергентными оказались белки штаммов SBY1880-6B и ATCC 66812: выявлено до 15 аминокислотных замен по сравнению с белками других штаммов *S. cerevisiae*. Североамериканские штаммы *S. paradoxus* и дрожжи *S. cariocanus* имеют идентичные последовательности, которые сходны с эндо-полигалактуроназами штаммов *S. paradoxus*, выделенными на Гавайях,

Дальнем Востоке и в Европе, соответственно, на 98.3%, 98.6% и 98.1–98.3%. Белки Pgu1p дальневосточных и европейских штаммов идентичны на 99.4–99.7%, а их сходство с эндо-полигалактуроназами гавайских штаммов не превышало 97%. Сходство эндо-полигалактуроназ дрожжей *S. cerevisiae* и *S. paradoxus/S. cariocanus* составило 94.9–97.9%.

Второй подкластер объединяет дрожжи *S. mikatae* и *S. jurei*, эндо-полигалактуроназы которых сходны на 95.0–96.4%. Белки Pgu1m (хромосома X) дрожжей *S. mikatae* идентичны на 97.2–100%, тогда как белки Pgu2m (хромосома VIII) сходны на 96.7–99.7%. Сходство белков Pgu1m и Pgu2m составляет 95.8–98.6%. Интересно отметить, что по последовательностям Pgu штаммы *S. mikatae* разделились на две группы: первая группа объединила штаммы NBRC 1815, NBRC 1816, NBRC 11000, во вторую группу попал штамм NBRC 10992 (рис. 36). Ранее было обнаружено аналогичное деление на две группы штаммов *S. mikatae* по ITS-последовательностям рДНК (Наумова и др., 2011).

В третий подкластер попали белки Pgu1k дрожжей *S. kudriavzevii*, которые идентичны между собой на 98.3–100%. Последовательности Pguk европейских и дальневосточных штаммов сходны на 98.3–98.9%, тогда как эндо-полигалактуроназы последних штаммов практически идентичны между собой – 99.2–99.7%. В целом, сходство эндо-полигалактуроназ трех подкластеров составило 87.7–92.2%. К первому кластеру примыкает белок Pgu1a дрожжей *S. arboricola*, сходство которого с соответствующими белками дрожжей *S. cerevisiae*, *S. cariocanus*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* составило 85.5–87.7%.

Второй кластер включает белки Pgu1b дрожжей *S. bayanus*, которые сходны на 90.2–100% (рис. 36). Сходство белков этого кластера с белками Pgu других видов *Saccharomyces* составило 84.5–89.5%.

Интересно отметить, что гены *PGU1b* гибридных дрожжей *S. pastorianus* CBS 1538 и штаммов *S. bayanus* var. *bayanus* идентичны. Нуклеотидные последовательности гена *PGU1b* штамма CBS 1538 и эндо-

полигалактуроназных генов других штаммов *S. pastorianus*, депонированных в GenBank, также идентичны, включая как старые коллекционные штаммы CBS 1486, CBS 1503, CBS 1513, так и современные коммерческие пивные дрожжи низового брожения W34/70 и Weihenstephan 34/70. Важно заметить, что в геноме всех указанных штаммов *S. pastorianus* не обнаружено пектиназных генов *S. cerevisiae*-типа.

8.8. Обсуждение

Таким образом, обнаружен значительный внутривидовой полиморфизм белков эндо-полигалактуроназ у дрожжей рода *Saccharomyces*; причем штаммы с очень низкой, средней и достаточно высокой пектинолитической активностью обнаружены практически у всех видов. Исключением являются виды *S. bayanus* и *S. paradoxus*, для которых характерна достаточно высокая активность. По-видимому, способность секретировать активную эндо-полигалактуроназу является видовой особенностью этих дрожжей. Если дрожжи *S. bayanus* ассоциированы с виноделием, то естественным местообитанием *S. paradoxus* являются сокотечения и кора широколиственных деревьев, в особенности различных видов дубов в Европе, Северной Америке и Дальневосточной Азии. Дрожжи *S. paradoxus* обитают также в лесной подстилке и самой почве, а также выделяются из различных насекомых, которые являются векторами их распространения в природе. По-видимому, полигалактуроновая составляющая пектина является важной частью углеводного питания обитающих в природе дрожжей. Интересно то, что для мицелиальных грибов, например, родов *Aspergillus* и *Sclerotinia*, также свойственно наличие мультигенных семейств эндо-полигалактуроназных генов (Bussink et al., 1992; Fraissinet-Tacher et al., 1995), что может свидетельствовать о высокой экологической значимости этого фермента.

0.05

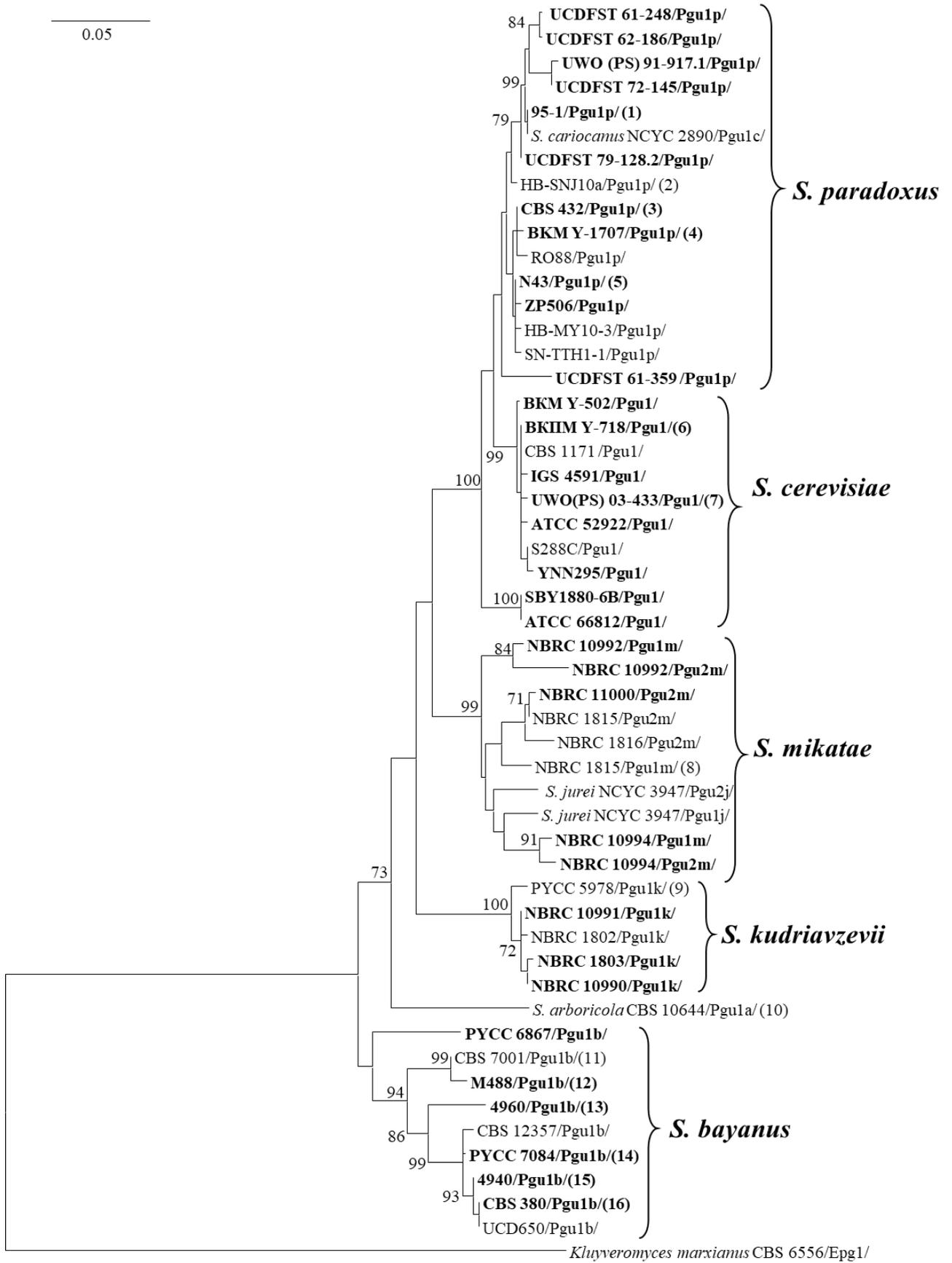


Рисунок 36. Филогенетический анализ сходства аминокислотных последовательностей эндо-полигалактуроназ Pgu дрожжей рода *Saccharomyces*. В качестве внешней группы использована последовательность эндо-полигалактуроназы дрожжей *Kluyveromyces marxianus*. Приводятся значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует 50 аминокислотным заменам на 1000 аминокислотных позиций. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов, имеющие идентичные аминокислотные последовательности: (1) – **UCDFST 52-153, UCDFST 69-1006, UCDFST 52-225, UCDFST 61-220, UCDFST 73-538.2**; (2) – SN-TB12-1, BJ-DLS2-1, BJ-DLS32-26, SN-QL4-2, BJ-DLS60; (3) – **N17, CBS 406, M22, M6, M11, M12, M37, M40, N9, N15, N40**; (4) – **BKM Y-1708, BKM Y-1697**; (5) – N44, **BKM Y-505, BKM Y-1704, N47**, SN-ZZ18-9, BJ-DLS32-27, SN-HZZ6-2, XZ-98-1-1, SN-HZZ24-1, SN-ZZ59-1, HB-SNJ2a, RS9, SN-ZZ32-3, JL-WQ14-1, SN-HZZ1-1, SN-TTS3-10, JL-CB13-1, HB-XS3-1, HB-MY15-2, HB-XXY4-1, HB-XS1-1, HB-XS18-1, JL-CB5-1, HB-XS21-2; (6) – **Д302, КБП 5176, NCYC 2402, DJ-2A, DJ-2B, T8**; (7) – **UWO(PS) 03-459, UWO(PS) 03-641, UWO(PS) 05-217**; (8) – **NBRC 1816, NBRC 11000**; (9) – SR 85; (10) – AS 2.3319, AS 2.3318, NRRL Y-63703; (11) – CBS 395, **SC4, PJS1.94, UWO(PS) 99-808.3, PJS2.95**, M300, **CCY21-31-12, PYCC 6330, PYCC 7082**, CBS 377, **TBVIc2.95**, BKM Y-1146, **T5/6**, BKM Y-361, **T13/30, 4976**; (12) – 136.01, 148.01, NCAIM Y.00677, BKM Y-508, **CBS 8711, СЕСТ 10560, SRC258, PYCC7083**; (13) – **4962, 4965**; (14) – **уHKS210, PYCC 7085, PYCC 7086, PYCC 7087, PYCC 7088**; (15) – **4946, 4947, 4948**; (16) – **CBS 378, NBRC 1948**. Жирным шрифтом отмечены штаммы, нуклеотидные последовательности которых определены в данной работе

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Природное разнообразие дрожжей рода *Saccharomyces* изучено на материале большой коллекции штаммов различного экологического и географического происхождения с помощью различных молекулярных методов и гибридологического анализа. Впервые в России обнаружены дрожжи редкого вида *S. jurei* и разработан эффективный метод их молекулярной дифференциации от остальных семи видов рода *Saccharomyces*: *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii* и *S. arboricola*.

С помощью молекулярного кариотипирования и сравнительного анализа трёх ядерных и двух митохондриальных генов проведено молекулярно-генетическое изучение дрожжей *Saccharomyces* различной видовой принадлежности. Мультигенный филогенетический анализ показал, что недавно описанный вид *S. jurei* филогенетически наиболее близок виду *S. mikatae*, тогда как виды *S. bayanus* и *S. arboricola* являются наиболее дивергентными видами рода *Saccharomyces*. Анализ аминокислотных последовательностей β -фруктозидазных генов *SUC*, контролирующих ферментацию сахарозы, и эндо-полигалактуроназных генов *PGU* также доказал близкое генетическое родство видов *S. jurei* и *S. mikatae*.

Впервые проведен пульс-электрофорез хромосомных ДНК дрожжей *S. jurei*. С помощью Саузерн-гибридизации в молекулярном кариотипе этих дрожжей обнаружены две реципрокные хромосомные транслокации. Одна из них – уникальная и затрагивает хромосомы I и XIII; а другая транслокация – между хромосомами VI и VII – встречается также и в геноме вида *S. mikatae*. Проведенное нами детальное кариотипирование показало, что все восемь биологических видов рода *Saccharomyces* имеют одинаковое гаплоидное число хромосом, равное 16. Однако, одинаковые кариотипы (порядок и размеры всех 16 гомеологичных хромосом) имеют только три вида: *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* и *S. paradoxus* (Fisher et al., 2000). Так, у вида *S. arboricola* обнаружена одна реципрокная транслокация между хромосомами

IV и XIII (Liti et al., 2013). Три реципрокные транслокации выявлены у вида *S. bayanus*: между хромосомами XV/VIII, IV/II, и X/VI (Fisher et al., 2000; Naumova et al., 2005). У вида *S. cariocanus* имеется четыре реципрокные транслокации, затрагивающие восемь хромосом: IX/XV, II/XVI, XI/IV и XII/XIV (Naumov et al., 1995a; Fisher et al., 2000). Следует отметить, что у видов *S. arboricola*, *S. bayanus* и *S. cariocanus* все реципрокные транслокации являются видоспецифичными, а транслокация X/VI обнаружена только у разновидности *S. bayanus* var. *ivarum* и отсутствует у двух других разновидностей – *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. eubayanus*. Проведенный нами сравнительный анализ молекулярных кариотипов показал, что только хромосома III имеет примерно одинаковые размеры у всех биологических видов рода *Saccharomyces*. Именно на этой хромосоме расположен локус типа спаривания MAT и молчащие кассеты типов спаривания HMR/HML субтеломерной локализации (Mortimer et al., 1992). Обладая общей системой типов спаривания, биологические виды *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* могут скрещиваться между собой во всех комбинациях. Однако, образующиеся гибриды стерильны, в виду того, что они продуцируют нежизнеспособные аскоспоры (Naumov et al., 2000, 2010; Naseeb et al., 2017).

На материале штаммов различного экологического и географического происхождения изучен внутривидовой полиморфизм дрожжей *S. bayanus*. С помощью методов молекулярной и классической генетики показана сложная структура комплексного вида *S. bayanus*, который включает 5 генетических популяций: *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *ivarum*, *S. eubayanus*, западнокитайскую и новозеландскую популяции. Выживаемость гибридных аскоспор в скрещиваниях существенно зависела от родительских комбинаций и составила: 55–62% у гибридов *S. bayanus* var. *bayanus* × *S. eubayanus* 9–39% у гибридов *S. bayanus* var. *bayanus* × *S. bayanus* var. *ivarum* и 2.5–11% в скрещиваниях *S. bayanus* var. *ivarum* × *S. eubayanus* (рис. 25). Результаты гибридологического и молекулярного анализов свидетельствуют

о значительной генетической дивергенции западнокитайских и новозеландских штаммов, которые имеют как уникальные специфические *AluI*-профили рестрикции, так и демонстрируют значительные отличия по нуклеотидным последовательностям пяти ядерных генов (*FSY1*, *HIS3*, *MET2*, *MEL* и *PGU*) и митохондриальному гену (*FUN14*). Дивергентные западнокитайские и новозеландские штаммы образуют также полустерильные гибриды в скрещиваниях как между собой, так и со штаммами остальных популяций с выживаемостью аскоспор, равной 0–24.2% и 6.2–23.3% соответственно.

Проведенные ранее скрещивания более 100 штаммов *S. bayanus* var. *ivarum* различного происхождения (из Европы, Северной Америки, Азии, Южной Америки) были высокофертильны; выживаемость гибридных аскоспор составляла 95–100% (Naumov, 1996; Наумов и др., 2003; Naumov et al., 2000; Наумов, 2011). Однако, гибриды *S. bayanus* var. *ivarum* с остальными генетическими популяциями характеризовались низкой выживаемостью аскоспор – 2.5–39%; а гибриды *S. bayanus* var. *ivarum* с представителями западнокитайской популяции были практически стерильны: частота выживаемости аскоспор не превышала 0–1.2%. Следует отметить, что независимо от выживаемости аскоспор у всех изученных внутри- и межпопуляционных гибридов наблюдалось регулярное мейотическое расщепление контрольных маркеров, включая двойные ауксотрофы. Таким образом, между *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *ivarum*, *S. eubayanus*, новозеландской и западнокитайской популяциями нет полной межвидовой постзиготической изоляции. Согласно полученным генетическим и молекулярным данным вышеперечисленные таксоны относятся к одному биологическому виду *S. bayanus*, обладая дивергенцией геномов на уровне таксономических разновидностей.

Дрожжи *S. eubayanus* считаются одним из родительских геномов (наряду с *S. cerevisiae*) гибридных пивных дрожжей низового брожения *S. pastorianus*: *S. cerevisiae* × *S. eubayanus* (Baker et al., 2015; Hebly et al., 2015).

Однако, происхождение дрожжей *S. eubayanus* до сих пор считается дискуссионным. Одни авторы (Langdon et al., 2020; Nespolo et al., 2020) полагают, что именно Аргентина является местом происхождения дрожжей *S. eubayanus*, которые впоследствии распространились в другие регионы мира. С другой стороны, тибетские штаммы имеют наибольшее сходство с пивным коммерческим штаммом Weihenstephan 34/70 по сравнению с дрожжами *S. eubayanus* из других регионов мира, включая Аргентину (Bing et al., 2014; Brouwers et al., 2019). На этом основании авторы считают, что именно тибетские, а не аргентинские, штаммы являются донором холодоустойчивого родителя европейских гибридных пивных дрожжей низового брожения.

Проведенный в работе филогенетический анализ ряда ядерных и митохондриальных генов свидетельствует о близком генетическом родстве европейского природного штамма *S. eubayanus* UCD650 и тибетских штаммов. Сравнительный анализ ядерных и митохондриальных генов также выявил близкое генетическое родство дрожжей *S. eubayanus* и *S. bayanus* var. *bayanus*. В отличие от *S. bayanus* var. *ivarum* и *S. eubayanus*, распространенных в разных регионах мира, все известные штаммы *S. bayanus* var. *bayanus* были выделены исключительно в Европе, в основном из источников пивоварения и различных соков (Naumova et al., 2005; Pérez-Través et al., 2014). По-видимому, европейская популяция *S. bayanus* var. *bayanus* является связующим звеном между *S. eubayanus* и *S. bayanus* var. *ivarum*. На это также указывает достаточно высокая выживаемость гибридных аскоспор при скрещивании типовой культуры *S. eubayanus* и штаммов *S. bayanus* var. *bayanus* (CBS 425 и CBS 380): 55–62% (Наумов, 2017). С другой стороны, гибрид между разновидностями *S. bayanus* var. *bayanus* NBRC 1948 × *S. bayanus* var. *ivarum* CBS 7001 имел 54%-ную выживаемость аскоспор, тогда как гибрид между штаммами в пределах разновидности *S. bayanus* var. *bayanus* NBRC 1948 × *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 424 был полустерильным с выживаемостью аскоспор 23.4%. Более того,

характерная для *S. bayanus* var. *ivarum* реципрокная транслокация, затрагивающая хромосомы VI и X, отсутствует у штаммов *S. eubayanus*, новозеландской и западнокитайской популяций, но имеется у некоторых штаммов *S. bayanus* var. *bayanus* – NBRC 1948 и CBS 378 (оба штамма выделены в условиях пивоварения). Указанная реципрокная транслокация может иметь адаптивное значение для дрожжей *S. bayanus* var. *ivarum*, специфической экологической нишей которых является виноделие и виноградарство при пониженных температурах. На примере винных штаммов *S. cerevisiae* показано, что реципрокная транслокация между хромосомами VIII и XVI приводит к повышенной устойчивости к сульфиту – антиоксиданту и антимикробному агенту, широко используемому в виноделии (Perez-Ortin et al., 2002; Наумов и др., 2013).

Сравнительный анализ полноразмерных геномов *S. cerevisiae* и остальных семи видов *Saccharomyces* показал, что наиболее изменчивыми являются субтеломерные районы хромосом; это варибельная (пластичная) часть генома, обеспечивающая приспособляемость дрожжей к различным условиям среды (Kellis et al., 2003; Liti et al., 2013; Naseeb et al., 2018). Именно в субтеломерных участках хромосом расположены полимерные гены ферментации различных сахаров (сахарозы, мальтозы, изомальтозы, мелибиозы, и др.), а также гены *PGU*, контролирующие расщепление пектина (Mortimer et al., 1992).

Способность ферментировать мальтозу и изомальтозу является важной характеристикой для пекарских и пивных дрожжей *Saccharomyces*. В геноме генетической линии *S. cerevisiae* S288C имеется два гена *MAL12* и *MAL32*, а также обнаружено новое близкородственное семейство изомальтозных генов *IMA1–IMA5* (Наумов, Наумов, 2010; Brown et al., 2010; Teste et al., 2010). Для установления происхождения α -глюкозидаз IMA и MAL нами был проведен поиск гомологичных α -глюкозидаз (мальтаз и изомальтаз) у других видов рода *Saccharomyces* и филогенетически родственных родов *Lachancea* и *Kluveromyces* в базе данных GenBank. Установлено, что некоторые

изоформы MAL и IMA дрожжей *Kluuveromyces* и *Lachancea* находятся в близком филогенетическом родстве с соответствующими α -глюкозидазами дрожжей рода *Saccharomyces*: степень сходства составляет 75–80.6% и 75–86.2% соответственно. В то же время, дивергентные изомальтазы IMA5 видов *Saccharomyces* и α -глюкозидазы MAL и IMA родов *Lachancea* и *Kluuveromyces* сходны только на 57.8–66%. Принимая во внимание то, что виды разных родов дрожжей не могут скрещиваться, а их геномы рекомбинировать, нахождение близкородственных α -глюкозидаз у представителей разных родов можно объяснить только их общим эволюционным происхождением. В настоящее время хорошо обоснована концепция полной дубликации геномов в ходе эволюции некоторых родов дрожжей, в том числе видов рода *Saccharomyces*, тогда как у видов протоплоидных родов *Lachancea* и *Kluuveromyces* она не проходила (Kellis et al., 2004; Scannell et al., 2007; Souciet et al., 2009; Dujon, Louis, 2017). Причем, полная дубликация восьми предковых хромосом у дрожжей *S. cerevisiae* произошла уже после их расхождения с дрожжами рода *Lachancea* (Souciet et al., 2009; Dujon, Louis, 2017).

Согласно проведенному нами филогенетическому анализу, изомальтазы (IMA1–IMA4) и мальтазы (MAL) образовались у общего протоплоидного предка дрожжей родов *Saccharomyces*, *Lachancea* и *Kluuveromyces*, т.е. до их расхождения и до полной дубликации генома *Saccharomyces*. Затем в каждом роде, виде и даже штамме происходила дивергенция собственных генов α -глюкозидаз, имеющих как IMA, так и MAL активности. Дивергентная изомальтаза IMA5 появилась в геноме дрожжей *Saccharomyces* уже после их расхождения с протоплоидными дрожжами *Lachancea* и *Kluuveromyces*.

Расщепление высокомолекулярных пектиновых веществ растительного происхождения – сложный процесс с участием нескольких ферментов, основным из которых является пектиназа (эндо-полигалактуроназа, К.Ф. 3.2.1.15). Известно, что даже незначительное содержание пектиновых

веществ в вине может приводить к появлению коллоидных помутнений и засорению фильтров (Van Rensburg, Pretorius, 2000). В этой связи, целесообразно в качестве стартовых культур в виноделии использовать штаммы сахаромицетов, обладающих высокой пектинолитической активностью. Нами было изучено распространение и особенности пектиназных генов *PGU* у дрожжей *Saccharomyces* разной видовой принадлежности. Полученные результаты свидетельствуют о значительном полиморфизме нуклеотидных и аминокислотных последовательностей генов *PGU* дрожжей рода *Saccharomyces*. Согласно проведенному филогенетическому анализу, наибольшее сходство эндо-полигалактуроназ (>94.9%) отмечено для видов *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. cariocanus*, а также видов *S. mikatae* и *S. jurei*. Сходство белков Pgu остальных видов *Saccharomyces* было <92%. Наиболее дивергентными оказались эндо-полигалактуроназы дрожжей *S. arboricola* и *S. bayanus*, уровень сходства которых между собой и с белками Pgu остальных видов не превышал 89.5%.

В ходе проведенного исследования обнаружена видоспецифичность генов *PGU*, а также их внутривидовой полиморфизм у дрожжей *S. kudriavzevii*, который связан с географическим происхождением штаммов. Установлено, что североамериканская и дальневосточная популяции *S. paradoxus* характеризуются более высоким генетическим разнообразием, чем европейская и гавайская. Показано, что гены *PGU* гибридных пивных дрожжей *S. pastorianus* происходят от холодоустойчивых дрожжей *S. bayanus*, а не от *S. cerevisiae*. Эти результаты хорошо согласуются с тем, что дрожжи *S. bayanus* встречаются в пивоварении и обладают пектинолитической активностью, а традиционные пивные дрожжи вида *S. cerevisiae* этой активности не имеют. Так, например, выделенная из пивоварения типовая культура *S. cerevisiae* CBS 1171 не способна расщеплять пектин.

Согласно молекулярному кариотипированию и Саузерн-гибридизации, дрожжи *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* и *S. paradoxus*

обладают только одним геном *PGU*, тогда как у остальных трех видов обнаружено несколько полимерных генов *PGU*: два гена у видов *S. mikatae* и *S. jurei*, и три гена у вида *S. bayanus*. Независимо от источника и места выделения изученные штаммы *S. bayanus* var. *ivarum*, *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. eubayanus*, новозеландской и западнокитайской популяций имели генотип с тремя генами *PGU1b PGU2b PGU3b*. Исключением является французский винный штамм *S. bayanus* var. *ivarum* PJS1.94, имеющий генотип с двумя генными копиями *PGU1b PGU3b*; это единственный из всех изученных штаммов, который не способен гидролизовать полигалактуроновую кислоту. По-видимому, наличие всех трех генов *PGU* определяет способность дрожжей расщеплять пектиновые соединения.

Однокопийный ген *PGU1* референсного штамма *S. cerevisiae* S288C расположен в теломерном районе хромосомы X (<http://www.yeastgenome.org>). Такую же хромосомную локализацию имеют гены *PGU1a S. arboricola*, *PGU1c S. cariocanus*, *PGU1k S. kudriavzevii*, *PGU1p S. paradoxus*, а также один из генов *S. jurei* (*PGU1j*), *S. mikatae* (*PGU1m*) и *S. bayanus* (*PGU1b*). Можно предположить, что расположенный на хромосоме X ген *PGU1* является предковым, тогда как гены *PGU* другой хромосомной локализации появились в геномах дрожжей *S. bayanus*, *S. jurei* и *S. mikatae* в ходе эволюции позднее.

Из восьми видов *Saccharomyces* высокая пектинолитическая активность характерна для двух из них: *S. bayanus* и *S. paradoxus*. По-видимому, способность секретировать активную эндо-полигалактуроназу является видоспецифической особенностью этих дрожжей. Наибольшей пектинолитической активностью обладали североамериканские штаммы *S. paradoxus*, тогда как гавайские изоляты совсем не обладали способностью расщеплять пектин или имели очень слабую активность. Внутривидовой полиморфизм секреции эндо-полигалактуроназы характерен и для других видов рода *Saccharomyces*. Штаммы с очень низкой, средней и достаточно высокой пектинолитической активностью обнаружены практически у всех изученных видов.

Экологической нишей дрожжей вида *S. bayanus* является виноградарство и виноделие (Наумов и др., 2011). С другой стороны, дрожжи *S. paradoxus* не связаны с хозяйственной деятельностью человека и встречаются преимущественно в природных условиях (Наумов, 2013). Дрожжи *S. paradoxus* обнаруживают в сокотечениях и коре различных деревьев, особенно дубов, в лесной подстилке и самой почве, на насекомых, на диких ягодах и др. Круглогодичное изучение эпифитных дрожжевых сообществ в Московской области показало, что в начале лета и конце зимы на живых и разлагающихся листьях некоторых видов растений существенно возрастает численность дрожжей вида *S. paradoxus* (Глушакова и др., 2007). Это косвенно может указывать на экологическую значимость фермента эндополигалактуроназы. По-видимому, полигалактуроновая составляющая растительного пектина является важной частью углеводного питания обитающих в природе дрожжей *S. paradoxus*.

Масштабный скрининг пектинолитической активности у дрожжей *Saccharomyces* различного экологического и географического происхождения позволил обнаружить штаммы дрожжей *S. cerevisiae*, *S. bayanus* и *S. paradoxus*, которые способны секретировать активную эндополигалактуроназу и поэтому представляют интерес для дальнейших молекулярно-генетических исследований и селекционных работ с винными дрожжами. Таким образом, в ходе выполнения работы создана коллекция охарактеризованных молекулярными методами штаммов дрожжей видов *S. cerevisiae*, *S. bayanus* и *S. paradoxus*, которая может быть использована в дальнейших фундаментальных исследованиях, а также в селекционных и биотехнологических разработках.

ВЫВОДЫ

1. Впервые проведено молекулярное кариотипирование восьми видов рода *Saccharomyces*. В молекулярном кариотипе редкого вида *S. jurei* выявлены две реципрокные транслокации: одна уникальная (между хромосомами I и XIII), а вторая общая с дрожжами вида *S. mikatae* (хромосомы VI/VII).

2. Обнаружена значительная дивергенция молекулярных кариотипов видов *Saccharomyces*. Установлено, что только хромосома III, в которой расположен локус типа спаривания MAT, имеет примерно одинаковые размеры у всех восьми биологических видов рода *Saccharomyces*.

3. С помощью методов молекулярной и классической генетики охарактеризован комплексный вид *Saccharomyces bayanus*, в пределах которого обнаружены дивергентные популяции (новозеландская и западнокитайская), существенно отличающиеся по молекулярным маркерам и образующие полустерильные гибриды с остальными популяциями этого вида. Между разновидностями *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *ivarum*, *S. eubayanus*, новозеландской и западнокитайской популяциями отсутствует полная постзиготическая изоляция: все гибриды характеризовались регулярным мейотическим расщеплением контрольных ауксотрофных маркеров. Указанные популяции относятся к одному биологическому виду *S. bayanus* с дивергенцией геномов на уровне таксономических разновидностей.

4. Сравнительный филогенетический анализ множественных α -глюкозидаз показал, что изомальтазы (IMA1–IMA4) и мальтазы MAL образовались у общего протоплоидного предка дрожжей родов *Saccharomyces*, *Lachancea* и *Kluveromyces*. Дивергентная изомальтаза IMA5 появилась в геноме дрожжей *Saccharomyces* уже после их расхождения с протоплоидными дрожжами *Lachancea* и *Kluveromyces* и после полной дупликации генома *Saccharomyces*.

5. Установлен значительный внутри- и межвидовой полиморфизм секреции эндо-полигалактуроназы у дрожжей рода *Saccharomyces*. Из восьми

видов *Saccharomyces* высокая пектинолитическая активность характерна для двух видов – *S. bayanus* и *S. paradoxus*. Вероятно, способность секретировать активную эндо-полигалактуроназу является видоспецифической особенностью этих дрожжей.

6. Впервые изучена встречаемость и особенности пектиназных генов *PGU* у восьми видов рода *Saccharomyces*. Установлено, что дрожжи *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* и *S. paradoxus* обладают только одним геном *PGU*, расположенным на хромосоме X. У остальных трех видов обнаружены полимерные гены *PGU* с разной хромосомной локализацией: у видов *S. mikatae* и *S. jurei* две копии расположены на хромосомах X и VIII; у вида *S. bayanus* три копии – на хромосомах X, I и XIV.

7. С помощью филогенетического анализа установлена видоспецифичность пектиназных генов *PGU* у видов рода *Saccharomyces*, а также их внутривидовой полиморфизм у дрожжей *S. kudriavzevii*, который связан с географическим происхождением штаммов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арабидзе Г.В. Биохимические особенности дрожжей вида *Saccharomyces uvarum* // Прикл. Биохимия и микробиология. 1968. Т. 4. Вып. 5. С. 603–606.
2. Бачинская А.А. История развития и культуры нового дрожжевого грибка – *Saccharomyces paradoxus* // Журн. микробиологии. 1914. Т. 1. № 3/5. С. 231–247.
3. Баштанная И. И. Функциональные особенности рас дрожжей в условиях первичного виноделия Молдавии и жизнедеятельность их при низких температурах // Автореферат дис. на соискание ученой степени кандидата биологических наук. АН МССР. Кишинев. 1970. 20с.
4. Журавлева Г.А., Миронова Л.Н., Инге-Вечтомов С.Г. Геном дрожжей и первые шаги в постгеномную эру// Молекулярная биология. 2000. Т. 34. С. 474–484.
5. Захаров И.А., Кожин С.А. Кожина Т.Н. Федорова И.В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов // Л.: Изд-во Наука. 1984. 144с.
6. Коршунова И.В., Наумова Е.С., Наумов Г.И. // Молекуляр. биология. 2005. Т. 39. № 3. С. 413–419.
7. Косиков К.В., Бочаров С.Н. Изменчивость дрожжей *Saccharomyces paradoxus* при культивировании в лабораторных условиях // Труды Института Генетики. 1961. № 28. С. 217–227.
8. Кретович В.Л. Биохимия растений / В.Л. Кретович // М.: Высш. шк. 1986. 503с.
9. Кудрявцев В.И. Систематика дрожжей / В.И. Кудрявцев // М.: Изд-во АН СССР. 1954. 427с.
10. Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ / В.В. Лукашов // М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2009. 256 с.
11. Михайлова Ю.В. Кастелло С., Наумова Е.С., Наумов Г.И. Алло- и симпатрические виды-двойники *Saccharomyces cerevisiae*: ДНК-ДНК гомология // Экологическая генетика. 2009. Т. VII. №4. С. 3–7.

12. Надсон Г.А., Красильников Н.А. Об обратимости развития дрожжей *Saccharomyces paradoxus* Batschin. // Микробиол. Журн. 1925. Т. 1. Вып. 2. С. 115–117.
13. Наумов Г. И. Генетическая идентификация дрожжей *Saccharomyces kudriavzevii* из европейской популяции // Экологическая генетика. 2009. Т. 7. № 1. С. 9–11.
14. Наумов Г.И. Биологический вид *Saccharomyces terrestris* // ДАН СССР. 1979. Т. 249. № 5. С. 1228–1230. Naumov G.I. The biological species *Saccharomyces terrestris* // Dokl. Biol. Sci. 1980. V. 249. № 1–6. P. 1248–1250.
15. Наумов Г.И. Основные направления генетики микроорганизмов / Наумов Г.И., Кондратьева В.И., Наумова Е.С. // М.: Наука. 1985. 136с.
16. Наумов Г.И. Генетическая дифференциация и экология дрожжей *Saccharomyces paradoxus* Batschinskaia // ДАН СССР. 1986. Т. 291. № 3. С. 754–757. Naumov G.I. Genetic differentiation and ecology of the yeast *Saccharomyces paradoxus* Batschinskaia // Dokl. Botan. Sci. 1986. V. 289–291. P. 213–216.
17. Наумов Г.И. Геносистематика дрожжей-аскомицетов (К выходу определителя “The yeasts. A taxonomic study”. 1984) // Микробиология. 1987. Т.56. Вып. 3. С. 521–524.
18. Наумов Г.И. Гибридологическое изучение дрожжей рода *Saccharomyces* из экспедиционных сборов В.И. Кудрявцева (1934 и 1936гг.) // Микология и фитопатология. 1998. Т.22. №4. С.295–301.
19. Наумов Г.И. Дивергентная популяция дрожжей *Saccharomyces paradoxus* на Гавайях: вид *in statu nascendi* // ДАН. 1999. Т. 364. № 2. С. 281–283.
20. Наумов Г.И. Дифференциация генофонда культурных дрожжей *Saccharomyces*: восемь групп культиваров // ДАН. 1989. Т. 306. № 5. С. 1253–1255.

21. Наумов Г.И. Естественное разнообразие дрожжей – неисчерпаемый генофонд для фундаментальных и прикладных разработок // Успехи совр. биол. 1997. Т. 117. С. 185–195.
22. Наумов Г.И. Новая разновидность *Saccharomyces bayanus* var. *ivarum* comb. nov., установленная генетическим анализом // Микробиология. 2000. Т. 69. С. 410–414.
23. Наумов Г.И. Эколого-биогеографические особенности дрожжей *Saccharomyces paradoxus* Vatschinskaya и родственных видов: (I) ранние исследования // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 387–394.
24. Наумов Г.И., Кондратьева В.И., Наумова Т.И., Гудкова Н.К. Генетические основы классификации дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Изучение выживаемости аскоспор гибридов // Журн. общ. биол. 1983. Т. 44. № 5. С. 648–660.
25. Наумов Г.И., Наумов Д.Г. Молекулярно-генетическая дифференциация α -глюкозидаз дрожжей: мальтазы и изомальтазы // Микробиология. 2012. Т. 81. № 3. С. 301–305.
26. Наумов Г.И., Наумов Д.Г., Луис Э.Д. Локализация семейства α -галактозидазных генов *MEL* в правых и левых теломерах дрожжей // ДАН. 1995. Т. 341. №1. С. 134–136.
27. Наумов Г.И., Наумова Е.С. *Saccharomyces douglasii* nom. nud. – синоним *S. paradoxus* согласно гибридологическому анализу // ДАН СССР. 1990. Т. 311. № 4. С. 975–977. Naumov G.I., Naumova E.S. *Saccharomyces douglasii*: a synonym of *S. paradoxus* as defined by hybridization analysis // Dokl. Biol. Sci. 1990. V. 311. P. 208–209.
28. Наумов Г.И., Наумова Е.С. Генетическая идентификация африканских культурных дрожжей *Saccharomyces* // Микробиология. 2011. Т. 80. № 3. С. 380–384.
29. Наумов Г.И., Наумова Е.С. Полигенный контроль ферментации бета-фруктозидов у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: новые гены *SUC9* и *SUC10* // Микробиология. 2010б. Т. 79. С. 180–186.

30. Наумов Г.И., Наумова Е.С., Мартыненко Н.Н., Корхола М. Реидентификация хромосомных CUP1 транслокаций у винных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 203–211.
31. Наумов Г.И., Наумова Е.С., Мартыненко Н.Н., Маснёф-Помаред И. Таксономия, экология и генетика дрожжей *Saccharomyces bayanus* – нового объекта в науке и практике // Микробиология. 2011. Т. 80. С. 723–730.
32. Наумов Г.И., Никоненко Т.А. Дивергенция геномов культурных и диких дрожжей *Saccharomyces sensu stricto*: четыре вида-двойника // ДАН. 1987. Т. 294. № 2. С. 476–479.
33. Наумов Г.И., Никоненко Т.А. Восточная Азия – вероятная родина культурных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Известия СО АН СССР. 1988. № 20. Вып. 3. С. 97–101.
34. Наумов Г.И., Серпова Е.В., Наумова Е.С. Генетически изолированная популяция *Saccharomyces cerevisiae* в Малайзии // Микробиология. 2006. Т. 75. № 2. С. 1–5.
35. Наумов Г.И., Шаламитский М.Ю., Мартыненко Н.Н., Наумова Е.С. Молекулярная филогения пектиназных генов *PGU* дрожжей рода *Saccharomyces* // Микробиология. 2016а. Т. 85. Р. 703–712.
36. Наумов Г.И., Шаламитский М.Ю., Наумова Е.С. Новое семейство пектиназных генов *PGU1b–PGU3b* у пектинолитических дрожжей *Saccharomyces bayanus* var. *ivarum* // ДАН. 2016б. Т. 467. С. 109–111.
37. Наумов Г.И., Юркевич В.В. Изменчивость биохимических признаков, используемых в таксономии дрожжей *Saccharomyces* // Успехи совр. биол. 1970. Т. 70. 3(6). С. 315–325.
38. Наумов Г.И., Юркевич В.В. Опероноподобная система дрожжей // Вест. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 1985. Т. 40. № 3. С. 40–42.
39. Наумов Д.Г., Наумов Г.И. Обнаружение нового семейства α-глюкозидазных генов *IMA* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // ДАН. 2010. Т. 432. № 4. С. 549–551.

40. Наумов, Г.И. Газдиев Д.О., Наумова Е.С. Обнаружение биологического вида *Saccharomyces bayanus* в Дальневосточной Азии // Микробиология. 2003. Т.72. №6. С.834–839.
41. Наумов, Г.И. Генетическое родство и биологический статус индустриально важных дрожжей *Saccharomyces eubayanus* Sampaio et al. // ДАН. 2017. Т.473. №5. С.622–625.
42. Наумова Е. С., Наумов Г.И., Майклз К.А., Бериташвили Д.Р. Идентификация хромосомных ДНК у дрожжей *Saccharomyces bayanus* и *S. pastorianus* // ДАН СССР. 1991. Т. 361. №3. С. 744–746.
43. Наумова Е.С., Наумов Г.И., Корхола М. Молекулярные кариотипы различных генетических линий дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Биотехнология. 1993. № 4. С. 2–5.
44. Наумова Е.С., Садыкова А.Ж., Мартыненко Н.Н., Наумов Г.И. Молекулярный полиморфизм β -фруктозидазных генов *SUC* дрожжей *Saccharomyces* // Молекулярная биология. 2014. Т. 48. С. 658–668.
45. Наумова Е.С., Серпова Е.В., Коршунова И.В., Наумов Г.И. Молекулярный полиморфизм α -галактозидазных генов *MEL* дрожжей *Saccharomyces* // Микробиология. 2011. Т. 80. Р. 496–507. Naumova E.S., Serpova E.V., Korshunova I.V., Naumov G.I. Molecular polymorphism of α -galactosidase *MEL* genes of *Saccharomyces* yeasts // Microbiology (Moscow). 2011. V.80. P. 502–513.
46. Наумова Е.С., Шаламитский М.Ю., Наумов Г.И. Молекулярный полиморфизм пектиназных генов *PGU* дрожжей *Saccharomyces bayanus* var. *ivarum* // Биотехнология. 2019. Т. 35. № 2. С. 30–37.
47. Сайфина Д.Ф., Николаева Е.Ю., Цепяева О.В., Исхакова Г.Г. Пектин: получение, структура и перспективы применения // Георесурсы. 2000. № 2. С. 36–38.
48. Сапожникова Е.В. Пектиновые вещества плодов / Е.В. Сапожникова // М.: Наука. 1965. 182с.

49. Серпова Е. В., Кишковская Н. Н., Мартыненко Н. Н., Наумова Е. С. Молекулярно-генетическая идентификация винных дрожжей Крыма // Биотехнология. 2011. № 6. С. 47–54.
50. Ушанова В.М., Батура Н.Г., Воробьева З.К. Изучение влияния функциональных групп пектинов из коры хвойных пород деревьев на их студнеобразующие свойства // Хвойные бореальной зоны. 2008. XXV. № 3–4. С. 362–364.
51. Almeida P., Gonçalves C., Teixeira S., Libkind D., Bontrager M., Masneuf-Pomarède I., Albertin W., Durrens P., Sherman D. J., Marullo Ph., Hittinger Ch. T., Gonçalves P., Sampaio J. P. A Gondwanan imprint on global diversity and domestication of wine and cider yeast *Saccharomyces uvarum* // Nat. Commun. 2014. V. 5. P. 4044–4055. doi 10.1038/ncomms5044
52. Arroyo-López F. N., Pérez-Torrado R., Querol A., Barrio E. Modulation of the glycerol and ethanol syntheses in the yeast *Saccharomyces kudriavzevii* differs from that exhibited by *S. cerevisiae* and their hybrid // Food Microbiol. 2010. V. 27. P. 628–637.
53. Babbar N., Dejonghe W., Gatti M., Sforza S., Kathy E. Pectic oligosaccharides from agricultural by-products: production, characterization and health benefits // Crit. Rev. Biotechnol. 2016. V. 36. № 4. P. 594–606.
54. Bagherian H., Ashtiani F.Z., Fouladitajar A., Mohtashamy M. Comparisons between conventional, microwave- and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit // Chem. Engineering and Proc. 2011. V. 50. P. 1237–1243.
55. Bai F.-Y., Han D.-Y., Duan S.-F., Wang Q.-M. The ecology and evolution of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Genes. 2022. V. 13. P. 230–251.
56. Baker E., Wang B., Bellora N., Peris D., Hulfachor A. B., Koshalek J. A., Adams M., Libkind D., Hittinger Ch. T. The genome sequence of *Saccharomyces eubayanus* and the domestication of Lager-brewing yeasts // Mol. Biol. Evol. 2015. V. 32(11). P. 2818–2831. doi 10.1093/molbev/msv168

57. Barnett J. A. The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Reess: a short review for non-taxonomists // *Yeast*. 1992. V. 8. P. 1–23.
58. Belda I., Conchillo L. B., Ruiz J., Navascués E., Marquina D., Santos A. Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking // *Int. J. of Food Microbiol.* 2016. V. 223. P. 1–8.
59. Belloch C., Pérez-Torrado R., González S. S., Pérez-Ortín J. E., García-Martínez J., Querol A., Barrio E. Chimeric genomes of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* // *App. Envir. Microb.* 2009. P. 2534–2544.
60. Bellon J. R., Schmid F., Capone D. L., Dunn B. L., Chambers P. J. Introducing a new breed of wine yeast: interspecific hybridisation between a commercial *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast and *Saccharomyces mikatae* // *PLoS ONE*. 2013. V. 8(4). P. e62053.
61. Bensasson D., Zarowiecki M., Burt A., Koufopanou V. Rapid evolution of yeast centromeres in the absence of drive // *Genetics*. 2008. V. 178(4). P. 2161–2167.
62. Berbegal C., Polo L., García-Esparza M.J., Álvarez I., Zamora F., Ferrer S., Pardo I. Influence of the dry yeast preparation method on final sparkling wine characteristics // *Fermentation*. 2022. 8. P. 313. doi.org/10.3390/fermentation8070313
63. Bergin S. A., Connor Hession S. A., Ó Cinnéide E., Ryan A., Byrne K. P., Ó Cróinín T., Wolfe K. H., Butler G. Identification of European isolates of the lager yeast parent *Saccharomyces eubayanus* // *FEMS Yeast Res.* 2022. V. 22. P. 1–9.
64. Bergstrom A., Simpson J.T., Salinas F., Barre B., Parts L., Zia A., Nguyen Ba A.N., Moses A.M., Louis E.J., Mustonen V., et al. A high-definition view of functional genetic variation from natural yeast genomes // *Mol. Biol. Evol.* 2014. V. 31. P. 872–888.
65. Bicknell J.N., Douglas H.C. Nucleic acid homologies among species of *Saccharomyces* // *J. Bacteriol.* 1970. V. 101. P. 505–512.

66. Bing J., Han P.J., Liu W.Q., Wang Q.M., Bai F.-Y. Evidence for a Far East Asian origin of lager beer yeast // *Curr. Biol.* 2014. V. 24. P. 380–381.
67. Blanco P., Sieiro C., Villa T. G. Production of pectic enzymes in yeasts // *FEMS Microbiology Letters.* 1999. V. 175. Iss. 1. P. 1–9.
68. Blanz P. A., Unseld M. Ribosomal RNA as a taxonomic tool in mycology // *Studies in Mycol.* 1987. V. 30. 245–258.
69. Boeke J. D. LaCroute, Fink G.R. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity // *Mol. Gen. Genet.* 1984. V. 197. P. 345–346.
70. Bon E., Neuvéglise C., Casaregola S., Artiguenave F., Wincker P., Aigle M., Durrens P. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 5. *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* // *FEBS Lett.* 2000. V. 487. P. 37–41.
71. Bradbury J., Richards K., Niederer H., Lee S., Rod Dunbar P., Gardner R. A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2006. V. 89. P. 27–37.
72. Brenes-Pomales A., Lindegren G., Lindegren C.C. Gene control of copper sensitivity in *Saccharomyces* // *Nature.* 1955. V. 176. № 4487. P. 841–842.
73. Brouwers N., Brickwedde A., Gorter de Vries A.R., van den Broek M., Weening S.M., van den Eijnden L., Diderich J.A., Bai F.-Y., Pronk J.T, Daran J.-M.G. Himalayan *Saccharomyces eubayanus* genome sequences reveal genetic markers explaining heterotic maltotriose consumption by *Saccharomyces pastorianus* hybrids // *Appl. Environ. Microbiol.* 2019. V. 185. P. e01516–19.
74. Brown C.A., Murray A.W., Verstepen K.J. Rapid expansion and functional divergence of subtelomeric gene families in yeast // *Curr. Biol.* 2010. V. 20. P. 895–903.
75. Bussink H.J., Buxton F.P., Fraaye B.A., de Graaff L.H., Visser J. The polygalacturonase of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes // *Eur. J. Biochem.* 1992. V.208. P. 83–90.

76. Carlson M., Botstein D. Organization of the *SUC* gene family in *Saccharomyces* // Mol. Cell. Biol. 1983. V. 3. P. 351–359.
77. Carlson M., Botstein D. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase // Cell. 1982. V. 28. P. 145–154.
78. Carlson M., Celenza J.L., Eng F.J. Evolution of the dispersed *SUC* gene family of *Saccharomyces* by rearrangements of chromosome telomeres // Mol. Cell. Biol. 1985. V. 5. P. 2894–2902.
79. Charron M., Dubin R., Michels C. Structural and functional analysis of the *MAL I* locus of *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. and Cell. Biol. 1986. V. 6. № 11. P. 3891–3899.
80. Charron M., Read E., Haut Sh., Michels C. Molecular evolution of the telomere-associated *MAL* loci of *Saccharomyces* // Genetics. 1989. V. 122. P. 307–316.
81. Chow T.H.C., Sollitti P., Marmur J. Structure of the multigene family of *MAL* loci in *Saccharomyces* // Mol. Gen. Genet. 1989. V. 217. P. 60–69.
82. Chu G., Gunderson K. Separation of large DNA by a variable angle CHEF apparatus // Anal. Biochem. 1991. V. 194. P. 439–446.
83. Cliften P., Sudarsanam P., Desikan A., Fulton L., Fulton B., Majors J., Waterston R., Cohen B.A., Johnston M. Finding functional features in *Saccharomyces* genomes by phylogenetic footprinting // Science. 2003. V. 301. P. 71–76.
84. Cliften P.F., Hiller L., Fulton L. Survey *Saccharomyces* genomes to identify functional elements by comparative DNA sequence analysis // Genome Research. 2001. V. 11. P. 175–1186.
85. da Silva E.G., de Fátima Borges M., Medina C., Piccoli R.H., Schwan R.F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits // FEMS Yeast Res. 2005. V. 5. P. 859–865.

86. D'Angiolo M., Yue J.-X., De Chiara M., Barré B. P., Panis M.-J. G., Gilson E., Liti G. Telomeres are shorter in wild *Saccharomyces cerevisiae* isolates than in domesticated ones // *Genetics*. 2022. Iyac. 186.
87. Daniel H.-M., Sorrel T.C., Meyer W. Partial sequence analysis of the actin gene and its potential for studying the phylogeny of *Candida* species and their teleomorphs // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001. V. 51. P. 1593–1606.
88. Denayrolles M., de Villechenon E.P., Lonvaud-Funel A., Aigle M. Incidence of SUC-RTM telomeric repeated genes in brewing and wild wine strains of *Saccharomyces* // *Curr. Genet.* 1997. V. 31. P. 457–461.
89. Deng X., Petitjean M., Teste M.-A., Kooli W., Tranier S., François J.M., Parrou J.L. Similarities and differences in the biochemical and enzymological properties of the four isomaltases from *Saccharomyces cerevisiae* // *FEBS Open Bio.* 2014. V. 4. P. 200–212.
90. Devia J., Bastías C., Kessi-Perez E.I., Villarroel C.A., De Chiara M., Cubillos F.A., Liti G., Martínez C., Salinas F. Transcriptional activity and protein levels of horizontally acquired genes in yeast reveal hallmarks of adaptation to fermentative environments // *Front. Genet.* 2020. V. 11. Art. 293.
91. Divol B., Rensburg P. *PGUI* gene natural deletion is responsible for the absence of endo-polygalacturonase activity in some wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Yeast Res.* 2007. V. 7. P. 1328–1339.
92. Dujon B. Hemiascomycetous yeasts at the forefront of comparative genomics // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2005. V. 15. P. 614–620.
93. Dujon B., Sherman D., Fischer G. et al. Genome evolution in yeasts // *Nature.* 2004. V. 430. P. 35–44.
94. Dujon B.A., Louis E.J. Genome diversity and evolution in the budding yeasts (*Saccharomycotina*) // *Genetics.* 2017. V. 206. № 2. P. 717–750.
95. Dulermo R., Legras J.-L., Brunel F., Devillers H., Sarilar V., Neuvéglise C., Nguyen H.-V. Truncation of Gal4p explains the inactivation of the *GAL/MEL* regulon in both *Saccharomyces bayanus* and some *Saccharomyces cerevisiae* wine strains // *FEMS Yeast Research.* 2016. V. 16. Fow. 070.

96. Dunn B., Sherlock G. Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus* // Gen. Res. 2008. V. 18(10). P.1610–1623.
97. Eberlein C., Hénault M., Fijarczyk A., Charron G., Bouvier M., Kohn L.M., Anderson J.B., Landry C.R. Hybridization is a recurrent evolutionary stimulus in wild yeast speciation // Nat Commun. 2019. V. 10(1). P. 923–937.
98. Esberg A., Muller L. A. H., McCusker J. H. Genomic structure of and genome-wide recombination in the *Saccharomyces cerevisiae* S288C progenitor isolate EM93 // PLoS ONE. 2011. V. 6. P. e25211.
99. Eschstruth A., Divol B. Comparative characterization of endopolygalacturonase (Pgu1) from *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* under wine-making conditions // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 91. P. 623–634.
100. Fasoli M., Dell'Anna R., Dal Santo S., Balestrini R., Sanson A., Pezzotti M., Monti F., Zenoni S. Pectins, hemicelluloses and celluloses show specific dynamics in the internal and external surfaces of grape berry skin during ripening // Plant Cell Physiol. 2016. V. 57. № 6. P. 1332–1349.
101. Fernández-González M., Ubeda J.F., Vasudevan T.G., Cordero Otero R.R., Briones A.I. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains // FEMS Microbiol. Lett. 2004. V. 237. P. 261–266.
102. Fischer G., James S.A., Roberts I.N., Oliver S.G., Louis E.S. Chromosomal evolution in *Saccharomyces* // Nature. 2000. V. 405. P. 451–454.
103. Fitzpatrick D. Logue M. E., Stajich J. E. Butler G. A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis // BMC Evolutionary Biology. 2006. V. 6. P. 99–113.
104. Fraissinet-Tacher L., Reymond-Cotton P., Fevre M. Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum* // Curr. Genet. 1995. V. 29. P. 96–99.

105. Gainvors A., Karam N., Lequart C., Belarbi A. Use of *Saccharomyces cerevisiae* for the clarification of fruit juices // *Biotechnol. Lett.* 1994. V. 16. P. 1329–1334.
106. Gancedo J. M., Flores C.-L., Gancedo C. The repressor Rgt1 and the cAMP-dependent protein kinases control the expression of the *SUC2* gene in *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochimica et Biophysica Acta* 1850. 2015. P. 1362–1367.
107. Gayevskiy V., Goddard M. *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces arboricola* reside in North Island native New Zealand forests // *Environ. Microbiol.* 2016. V. 18. P. 1137–1147.
108. Giannakou K., Visinoni F., Zhang P., Nathoo N., Jones P., Cotterrell M., Vrhovsek U., Delneri D. Biotechnological exploitation of *Saccharomyces jurei* and its hybrids in craft beer fermentation uncovers new aroma combinations // *Food Microbiol.* 2021. V. 100. P. 103838.
109. Gibson B., Geertman J.-M. A., Hittinger C. T., Krogerus K., Libkind D., Louis E. J. New yeasts – new brews: modern approaches to brewing yeast design and development // *FEMS Yeast Res.* 2017. V. 17. № 4. P. 1–13.
110. Goddard M. R., Burt A. Recurrent invasion and extinction of a selfish gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 1380–1385.
111. Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., et al. Life with 6000 genes // *Science.* 1996. V. 274. №5287. P. 546–567.
112. Gognies S., Gainvors A., Aigle M., Belarbi A. Cloning, sequence analysis and overexpression of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase-encoding gene (*PGLI*) // *Yeast.* 1999. V. 15. P. 11–22.
113. Gonzalez R., Morales P. Truth in wine yeast // *Microbial Biotechnology.* 2022. V. 15(5). P. 1339–1356.
114. Gonzalez S.S., Barrio E., Gafner J., Querol A. Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces*

- kudriavzevii* in wine fermentations// FEMS Yeast Res. 2006. V. 6. P. 1221–1234.
115. Gonzalez S.S., Barrio E., Querol A. Molecular characterization of new natural hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* from brewing // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. P. 2314–2320.
116. Gorter de Vries A. R., Pronk J. T., Daran J.-M. G. Industrial relevance of chromosomal copy number variation in *Saccharomyces yeasts* // Appl. Environ. Microbiol. 2017. V. 83. P. 3206–3216.
117. Goto-Yamamoto N., Kitano K., Shiki K. *SSUI-R*, a sulphite resistance gene of wine yeast, is an allele of *SSUI* with a different upstream sequence // J. Ferm. Bioengineer. 1998. V. 86. P. 427–433.
118. Groth G., Hansen J., Piškur J. A natural chimeric yeast containing genetic material from three species // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999. V. 49. P. 1933–1938.
119. Guilliermond A. Monographie des levures rapportées d’Afrique Occidentale par la mission Chevalier // Ann. Sci. Nat. 9 Sér. Bot. 1914. V. 19. P. 1–32.
120. Han D.-Y., Han P.-J., Rumbold K., Koricha A.D., Duan S.-F., Song L., Shi J.-Y., Li K., Wang Q.-M., Bai F.-Y. Adaptive gene content and allele distribution variations in the wild and domesticated populations of *Saccharomyces cerevisiae* // Front. Microbiol. 2021. V. 12. Art. 631250.
121. Harari Y., Gershon L., Alonso-Perez E., Klein Sh., Berneman Y., Choudhari K., Singh P., Sau S., Liefshitz B., Kupiec M. Telomeres and stress in yeast cells: When genes and environment interact // Fungal Biology. 2020. T. 124. P. 311–315.
122. He P.-Y., Shao X.-Qi., Duan S.-F., Han D.-Y., Li K., Shi J.-Y., Zhang R.-P., Han P.-J., Wang Q.-M., Bai F.-Y. Highly diverged lineages of *Saccharomyces paradoxus* in temperate to subtropical climate zones in China // Yeast. 2022. V. 39. P. 69–82.

123. Hebly M., Brickwedde A., Bolat I. et al. *S. cerevisiae* × *S. eubayanus* interspecific hybrid, the best of both worlds and beyond // FEMS Yeast Res. 2015. V. 15. № 3. P. 23–36.
124. Hittinger Ch. T., Rokas A., Carroll S. B. Parallel inactivation of multiple *GAL* pathway genes and ecological diversification in yeasts // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101(39). P. 14144–14149.
125. Hohmann S. A region in the yeast genome which favours multiple integration of DNA via homologous recombination // Curr Genet. 1987. V. 12. №7. P. 519–526.
126. <http://www.helicon.ru>
127. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
128. Hutzler M., Michel M., Kunz O., Kuusisto T., Magalhães F., Krogerus K., Gibson B. Unique brewing-relevant properties of a strain of *Saccharomyces jurei* isolated from ash (*Fraxinus excelsior*) // Front Microbiol. 2021. V. 12. P. 645–271.
129. Jayani R.S., Saxena S., Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: a review // Process Biochemistry. 2005. V. 40. P. 2931–2944.
130. Jensen V. Taxonomic studies on soil yeasts I. The genus *Saccharomyces* (Meyen)// Reess. Arsskr. K Vet Landbohøjsk. Copenhagen. 1967. P. 179–194.
131. Kaneko Y. Banno I. Reexamination of *Saccharomyces bayanus* strains by DNA-DNA hybridization and electrophoretic karyotyping// IFO Res. Comm. 1991. V. 15. P. 30–41.
132. Kashyap D. R., Vohra P. K., Chopra S., Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector // Bioresource Technology. 2001. V. 77. № 3. P. 215–227.
133. Kellis M., Birren B.W., Lander E.S. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Nature. 2004. V. 428. P. 617–624.

134. Kellis M., Patterson N., Endrizzi M., Birren B., Lander E.S. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements // *Nature*. 2003. V. 423. P. 241–254.
135. Koufopanou V., Hughes J., Bell G., Burt A. The spatial scale of genetic differentiation in a model organism: the wild yeast *Saccharomyces paradoxus* // *Philos. Trans. R. Soc. B*. 2006. V. 361(1475). P. 1941–1946.
136. Koufopanou V., Lomas S., Pronina O., Almeida P., Sampaio J. P., Mousseau T., Liti G., Burt A. Population size, sex and purifying selection: comparative genomics of two sister taxa of the wild yeast *Saccharomyces paradoxus* // *Genome Biol. Evol.* 2020. V. 12(9). P. 1636–1645.
137. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz Ch., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35(6). P. 1547–1549.
138. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers // *CABIOS*. 1994. V. 10. № 2. P. 189–191.
139. Kurtzman C.P. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygotorulaspora*// *FEMS Yeast Res.* 2003. V. 4. P. 233–245.
140. Kurtzman CP., Fell J.M., Boekhout T. *The Yeasts a Taxonomic Study* // Elsevier. 2011. 2354p.
141. Kurtzman C.P., Robnett C.J., Phylogenetic relationships among yeasts of the ‘*Saccharomyces complex*’ determined from multigene sequence analyses// *FEMS Yeast Res.* 2003. V. 3. P. 417–432.
142. Kurtzman, C.P., Robnett C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences// *Antonie van Leeuwenhoek*. 1998. V. 73. P. 331–371.

143. Langdon Q.K., Peris D., Eizaguirre J.I., Opulente D.A., Buh K.V., Sylvester K., Jarzyna M., Rodríguez M.E., Lopes Ch.A., Libkind D., Hittinger Ch.T. Postglacial migration shaped the genomic diversity and global distribution of the wild ancestor of lager-brewing hybrids // *PLoS Genet.* 2020. V. 16. № 4. P. e1008680.
144. Libkind D., Hittinger C.T., Valério, E., Gonçalves C., Dover J., Johnston M., Gonçalves P., Sampaio J.P. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V.108. P. 14539–14544.
145. Liti G., Carter D.M., Moses A.M., Warringer J., Parts L., James S.A., Davey R.P., Roberts I.N., Burt A., Koufopanou V., Tsai I.J., Bergman C.M., Bensasson D., O’Kelly M.J.T., van Oudenaarden A., Barton D.B.H., Bailes E., Nguyen Ba A.N., Jones M., Quail M.A., Goodhead I., Sims S., Smith F., Blomberg A., Durbin R., Louis E.J. Population genomics of domestic and wild yeasts // *Nature.* 2009. V. 458. P. 337– 341.
146. Liti G., David B., Barton H., Louis E.J. Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces* // *Genetics.* 2006. V. 174. P. 839–850.
147. Liti G., Nguyen Ba A.N., Blythe M., Müller C.A., Bergström A., Cubillos F.A., Dafhnis-Calas F., Khoshraftar S., Malla S., Mehta N., Siow C.C., Warringer J., Moses A.M., Louis E.J., Nieduszynski C.A. High quality de novo sequencing and assembly of the *Saccharomyces arboricolus* genome // *BMC Genomics.* 2013. V. 14. P. 69–83.
148. Liti G., Peruffo A., James S.A., Roberts I.N., Louis E.J. Inferences of evolutionary relationships from a population survey of LTR-retrotransposons and telomeric-associated sequences in the *Saccharomyces sensu stricto* complex // *Yeast.* 2005. V. 22. P. 177–192.
149. Llorente B., Malpertuy A., Blandin G., Artiguenave F., Wincker P., Dujon B. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 12. *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* // *FEBS Lett.* 2000. V. 487. P. 71–75.

150. Lodder J. Uber einige durch das "Centraalbureau voor Schimmelculturs." // Zentr. Bakt. 1932. II. 86. P. 227–253.
151. Lõoke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR based applications // Biotechniques. 2011. V. 50. P. 325–328.
152. Louis E.J., Haber J.E. The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*// Genetics. 1992. V. 131. P. 559–574.
153. Louis E.J., Naumova E.S., Lee A., Naumov G. and Haber J.E. The chromosome end in yeast: its mosaic nature and influence on recombinational dynamics // Genetics. 1994. V. 136.P. 789–802.
154. Louw C., La Grange D., Pretorius I.S., van Rensburg P. The effect of polysaccharide-degrading wine yeast transformants on the efficiency of wine processing and wine flavor // J. Biotechnol. 2006. V. 125. P. 447–461.
155. Louw C., Young P.R., van Rensburg P., Divol B. Epigenetic regulation of *PGUI* transcription in *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Yeast Res. 2010. V. 10. P. 158–167.
156. Macías L.G., Morard M., Toft C., Barrio E. Comparative genomics between *Saccharomyces kudriavzevii* and *S. cerevisiae* applied to identify mechanisms involved in adaptation // Front. Genet. 2019. V. 10. Art. 187.
157. Markovič O., Janeček Š. Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution // Prot. Engineering, Design and Select. 2001. V. 14. № 9. P. 615–631.
158. Marsit S., Mena A., Bigey F., Sauvage F.-X., Couloux A., Guy J., Legras J.-L., Barrio E., Dequin S., Galeote V. Evolutionary advantage conferred by an eukaryote-to-eukaryote gene transfer event in wine yeasts // Mol. Biol. Evol. 2015. V. 32. P. 1695–1707.
159. Masneuf I., Hansen J., Groth C., Piškur J., Dubourdieu D. New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeasts species found among wine and cider production strains // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. P. 3887–3892.

160. Masneuf I., Murat M.-L., Naumov G.I., Tominaga T., Dubourdieu D. Hybrids *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* having a high liberating ability of some sulfur varietal aromas of *Vitis vinifera* Sauvignon blanc wines // J. Int. Sci. Vigne Vin. 2002. V. 36. P. 205–212.
161. Masneuf-Pomarede I., Le Jeune C., Durrens P., Lollier M., Aigle M., Dubourdieu D. Molecular typing of wine yeast strains *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* using microsatellite markers // Syst. Appln. Microbiol. 2007. V. 30. P. 75–82. doi 10.1016/j.syapm.2006.02.006
162. May C.D. Industrial pectins: sources, production and applications // Carbohydrate Polymers. 1990. V. 12. P. 79–99.
163. Mayr E. Systematics and the Origin of Species. N.Y.: Columbia University Press. 1942.
164. McCarthy G.C., Morgan S.C., Martiniuk J.T., Newman B. L., McCann S. E., Measday V., Durall D. M. An indigenous *Saccharomyces uvarum* population with high genetic diversity dominates uninoculated Chardonnay fermentations at a Canadian winery // PLoS One. 2021. V. 16 (2). P. e0225615. doi 10.1371/journal.pone.0225615
165. Meyen J., Jahresbericht uber die Resultate der Arbeiten im Felde der physiologischen Botanik von der Jahre // Arch. Naturgesch. zweiter Band. 1838. V. 4. P. 1–186.
166. Molina F.I., Jong Sh.Ch., Huffman J.L. PCR amplification of the 3'-external transcribed and intergenic spacers of the ribosomal DNA repeat unit in three species of *Saccharomyces* // FEMS Microbiol. Lett. 1993. V. 108. P. 259–264.
167. Moore J.P., Fangel J.U., Willats W. G. T., Vivier M.A. Pectic- β (1,4)-galactan, extensin and arabinogalactan – protein epitopes differentiate ripening stages in wine and table grape cell walls // Annals of Botany. 2014. V. 114. P. 1279–1294.
168. Morais P.B., Hagler A.N., Rosa C.A., Mendonça-Hagler L.C., Klaczko L.B. Yeasts associated with *Drosophila* in tropical forests of Rio de Janeiro, Brazil // Can. J. Microbiol. 1992. V. 38. P. 1150–1155.

169. Morard M., Macías L.G., Adam A.C., Lairón-Peris M., Pérez-Torrado R., Toft C. Barrio E. Aneuploidy and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* // Front. Genet. 2019. V. 10. Art. 82.
170. Mortimer R.K., Contopoulou C.R., King J.S. Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*, Edition 11 // Yeast. 1992. V. 8. P. 817–902.
171. Mortimer R.K., Johnston J.R. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center // Genetics. 1986. V. 113. P.35–43.
172. Muir A., Harrison E., Wheals A. A multiplex set of species-specific primers for rapid identification of members of the genus *Saccharomyces*// FEMS. 2011. V. 11. P. 552–563.
173. Muller L. A. H., McCusker J. H. Nature and distribution of large sequence polymorphisms in *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Yeast Res. 2011. V. 11(7). P. 587–594.
174. Müller-Maatsch J., Bencivennia M., Caligiana A., Tedeschia T., Bruggeman G., Bosch M., Petrusan J., Van Droogenbroecke B., Elstf K., Sforza S. Pectin content and composition from different food waste streams // Food Chemistry. 2016. V. 201. P. 37–45.
175. Naseeb S., Alsammar H., Burgis T., Donaldson I., Knyazev N., Knight C., Delneri D. Whole genome sequencing, de novo assembly and phenotypic profiling for the new budding yeast species *Saccharomyces jurei* // Genes Genomes Genetics. 2018. V. 8. P. 2967–2977.
176. Naseeb S., James S.A., Alsammar H., Michaels C.J., Gini B., Nueno-Palop C., Bond C.J., McGhie H., Roberts I. N., Delneri D. *Saccharomyces jurei* sp. nov., isolation and genetic identification of a novel yeast species from *Quercus robur* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 2046–2052.
177. Naumoff D.G. Sequence-based classification of yeast glycoside hydrolases: CAZy vs. Génolevures // III Межд. Конф. “Математическая биология и биоинформатика”. Пушино (10–15 октября 2010 г.). 2010. С.139–140.

178. Naumov G., Naumova E. and Korhola M. Genetic identification of natural *Saccharomyces sensu stricto* yeasts from Finland, Holland and Slovakia// *Antonie van Leeuwenhoek*. 1992. V. 61. P. 237–243.
179. Naumov G., Naumova E., Turakainen H., Suominen P. and Korhola M. Polymeric genes *MEL8*, *MEL9* and *MEL10* – new members of α -galactosidase gene family in *Saccharomyces cerevisiae*// *Curr. Genet.*1991. V. 20. P. 269–276.
180. Naumov G., Turakainen H., Naumova E., Aho S. and Korhola M. A new family of polymorphic genes in *Saccharomyces cerevisiae*: α -galactosidase genes *MEL1-MEL7*// *Mol. Gen. Genet.* 1990. V. 224. P. 119–128.
181. Naumov G.I. Genetic basis for classification and identification of the ascomycetous yeasts// *Studies in Mycology*. 1987. V. 30. P. 469–475.
182. Naumov G.I. Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex // *J. Indust. Microbiol.* 1996. V. 17. P. 295–302.
183. Naumov G.I., James S.A., Naumova E.S., Louis E.J., Roberts I.N. Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae* // *Int. J. Evol. Microbiol.* 2000a. V. 50. P. 1931–1942.
184. Naumov G.I., Lee C.-F., Naumova E.S. Molecular genetic diversity of the *Saccharomyces* yeasts in Taiwan: *S. arboricola*, *S. cerevisiae* and *S. kudriavzevii* // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013. V. 103. P. 217–228.
185. Naumov G.I., Masneuf I., Naumova E.S., Aigle M., Dubourdieu D. Association of *S. bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations // *Res. Microbiol.* 2000. V. 151. P. 683–691.
186. Naumov G.I., Naumova E.S., Aigle M., Masneuf-Pomarede I., Belarbi A. Genetic reidentification of the pectinolytic yeast strain SCPP as *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001a. V. 55. P. 108–111.

187. Naumov G.I., Naumova E.S., Gaillardin C. Genetic and karyotypic identification of wine *Saccharomyces bayanus* yeasts isolated in France and Italy // Syst. Appl. Microbiol. 1993. V. 16. P. 274–279.
188. Naumov G.I., Naumova E.S., Gaillardin C., Turakainen, H., Korhola M. Identification of new chromosomes of *Saccharomyces bayanus* using gene probes from *S. cerevisiae*// Hereditas. 1994. V. 120. P. 121–126.
189. Naumov G.I., Naumova E.S., Hagler A.N., Mendonca-Hagler L.C., Louis E.J. A new genetically isolated population of the *Saccharomyces sensu stricto* complex from Brazil //Antonie van Leeuwenhoek. 1995a. V. 67. P. 351–355.
190. Naumov G.I., Naumova E.S., Korhola M. Chromosomal polymorphism of *MEL* genes in some populations of *Saccharomyces cerevisiae*// FEMS Microbiology Letters. 1995. V. 127. P. 41–45.
191. Naumov G.I., Naumova E.S., Lantto R.A., Louis E.J., Korhola M. Genetic homology between *Saccharomyces cerevisiae* and its sibling species *S. paradoxus* and *S. bayanus*: electrophoretic karyotypes// Yeast. 1992. V. 8. P. 599–612.
192. Naumov G.I., Naumova E.S., Lantto R.A., Louis E.J., Korhola M. Genetic homology between *Saccharomyces cerevisiae* and its sibling species *S. paradoxus* and *S. bayanus*: electrophoretic karyotypes// Yeast. 1992. V. 8. P. 599–612.
193. Naumov G.I., Naumova E.S., Louis E.J. Two new genetically isolated populations of the *Saccharomyces sensu stricto* complex from Japan// J. Gen. Appl. Microbiol. 1995b. V. 41. P. 499–505.
194. Naumov G.I., Naumova E.S., Masneuf-Pomarède I. Genetic identification of new biological species *Saccharomyces arboricolus* Wang et Bai // Antonie van Leeuwenhoek. 2010. V. 98. P. 1–7.
195. Naumov G.I., Naumova E.S., Sniegowski P.D. Differentiation of European and Far East Asian populations of *Saccharomyces paradoxus* by allozyme analysis // Int. J. System. Bacteriol. 1997a. V. 47. P. 341–344.

196. Naumov G.I., Naumova E.S., Sniegowski P.D. *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* are associated with exudates of North American oaks // Can. J. Microbiol. 1998. V. 44. P. 1045–1050.
197. Naumov G.I., Nguyen H.-V., Naumova E.S., Michel A., Aigle M., Gaillardin C. Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider-fermenting yeast // Int. J. Food. Microbiol. 2001b. V. 65. P. 163–171. doi 10.1016/S0168-1605(00)00515-8
198. Naumov G.I., Nikonenko T.A., Kondrat'eva V.I. Taxonomic identification of *Saccharomyces* from the yeast genetic stock center of the University of the California // Russian J. Genet. 1994. V. 30. P. 38–41.
199. Naumova E.S., Korshunova I.V., Jespersen L., Naumov G.I. Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer // FEMS Yeast Res. 2003. V. 3. P. 177–184.
200. Naumova E.S., Naumov G.I., Masneuf-Pomarede I., Aigle M., Dubourdieu D. Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae* // Yeast. 2005. V. 22. P. 1099–1115.
201. Naumova E.S., Naumov G.I., Michailova Y.V., Martynenko N.N., Masneuf-Pomarede I. Genetic diversity study of the yeast *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* reveals introgressed subtelomeric *Saccharomyces cerevisiae* genes // Res. Microbiol. 2011a. V. 162. P. 204–213.
202. Naumova E.S., Sadykova A. Zh., Martynenko N.N., Naumov G.I. Molecular polymorphism of β -fructosidase *SUC* genes in the yeast *Saccharomyces* // Mol. Biol. (Moscow). 2014. V. 48. P. 572–581.
203. Naumova E.S., Turakainen H., Naumov G.I., Korhola M. Superfamily of α -galactosidase *MEL* genes of the *Saccharomyces sensu stricto* species complex // Mol. Genet. 1996. V. 253. P. 111–117.
204. Needleman R.B., Kaback D.B., Dubin R.A., Perkins E.L., Rosenberg N.G., Sutherland A., Forrest D.B., Michels C.A. *MAL6* of *Saccharomyces*: a complex genetic locus containing three genes required for maltose fermentation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 2811–2815.

205. Nespolo R.F., Villarroel C.A., Oporto C.I., Tapia S.M., Vega-Macaya F., Urbina K., De Chiara M., Mozzachiodi S., Mikhalev E., Thompson D., Larrondo L.F., Saenz-Agudelo P., Liti G., Cubillos F.A. An Out-of-Patagonia migration explains the worldwide diversity and distribution of *Saccharomyces eubayanus* lineages // PLoS Genet. 2020. V. 16. № 5. P. e1008777.
206. Ness F., Aigle M. *RTM1*: A member of a new family of telomeric repeated genes in yeast // Genetics. 1995. V. 140. P.945–956.
207. Nguyen H.V., Gaillardin C. Evolutionary relationships between the former species *Saccharomyces uvarum* and the hybrids *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*; reinstatement of *Saccharomyces uvarum* (Beijerinck) as a distinct species // FEMS Yeast Res. 2005. V. 5. P. 471–483. doi 10.1016/j.femsyr.2004.12.004
208. Nguyen H.-V., Gaillardin C. Two subgroups within the *Saccharomyces bayanus* species evidenced by PCR amplification and restriction polymorphism of the non-transcribed spacer 2 in the ribosomal DNA unit // System. Appl. Microbiol. 1997. V. 20. P. 286–294.
209. Nguyen H.-V., Legras J.L., Neuvéglise C., Gaillardin C. Deciphering the hybridisation history leading to the Lager lineage based on the mosaic genomes of *Saccharomyces bayanus* strains NBRC 1948 and CBS 380 // PLoS One. 2011. V. 6 (10). P. e25821. doi 10.1371/journal.pone.0025821
210. Nguyen H.-V., Lepingle A., Gaillardin C. Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae*, including the *S. bayanus* type strain CBS 380 // System. Appl. Microbiol. 2000. V. 23. P. 71–85.
211. Nikulin J., Krogerus K., Gibson B. Alternative *Saccharomyces* interspecies hybrid combinations and their potential for low-temperature wort fermentation // Yeast. 2018. V. 35. № 1. P. 113–127.
212. Novo M., Bigey F., Beyne E., Galeote V., Gavory F., Mallet S., Cambon Br., Legras J.-L., Wincker P., Casaregola S., Dequin S. Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast

- Saccharomyces cerevisiae* EC1118 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 16333–16338.
213. Nunan K.J., Sims I.M., Bacic A., Robinson S.P., Fincher G.B. Isolation and characterization of cell walls from the mesocarp of mature grape berries (*Vitis vinifera*) // Planta. 1997. V. 203. P. 93–100.
214. O'Donnell S., Yue J.X., Saada O.A., Agier N., Caradec C., Cokelaer T., De Chiara M., Delmas S., Dutreux F., Fournier T., Friedrich A., Kornobis E., Li J., Miao Z., Tattini L., Schacherer J., Liti G., Fischer G. Telomere-to-telomere assemblies of 142 strains characterize the genome structural landscape in *Saccharomyces cerevisiae* // Nat Genet. 2023. V. 55(8). P. 1390–1399.
215. Park K.-C., Kwon S.-J., Kim N.-S. Intron loss mediated structural dynamics and functional differentiation of the polygalacturonase gene family in land plants // Genes & Genomics. 2010. V. 32. P. 570–577.
216. Park K.-C., Kwon S.-J., Kim P.-H., Bureau T., Kim N.-S. Gene structure dynamics and divergence of the polygalacturonase gene family of plants and fungus // Genome. 2008. V. 51. № 1. P. 30–40.
217. Pérez-Ortín J.E., Querol A., Puig S., Barrio E. Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains // Genome Res. 2002. V. 12. P. 1533–1539.
218. Pérez-Torrado R., Barrio E., Querol A. Alternative yeasts for winemaking: *Saccharomyces non-cerevisiae* and its hybrids // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2018. V. 58. P. 1780–1790.
219. Pérez-Través L., Lopes C.A., Querol A., Barrio E. On the complexity of the *Saccharomyces bayanus* taxon: hybridization and potential hybrid speciation // PLoS ONE. 2014. V. 9 (4). P. e93729.
220. Peris D., Langdon Q.K., Moriarty R.V., Sylvester K., Bontrager M., Charron G., Leducq J.B., Landry C.R., Libkind D., Hittinger C.T. Complex ancestries of lager-brewing hybrids were shaped by standing variation in the wild yeast *Saccharomyces eubayanus* // PLoS Genet. 2016. V. 12. Art. e1006155. P. 1–20.

221. Peris D., Sylvester K., Libkind D., Gonçalves P., Sampaio J.P., Alexander W.G., Hittinger C.T. Population structure and reticulate evolution of *Saccharomyces eubayanus* and its lagerbrewing hybrids // *Mol. Ecol.* 2014. V. 23. P. 2031–2045.
222. Peris D., Ubbelohde E. J., Kuang M. Ch. Kominek J., Langdon Q.K., Adams M., Koshalek J.A., Hulfachor A.B., Opulente D.A., Hall D.J., Hyma K., Fay J.C., Leducq J.B., Charron G., Landry C.R., Libkind D., Gonçalves C., Gonçalves P., Sampaio J.P., Wang Q.M., Bai F.Y., Wrobel R.L., Hittinger C.T. Macroevolutionary diversity of traits and genomes in the model yeast genus *Saccharomyces* // *Nature Communications.* 2023. V. 14. Art. Numb. 690.
223. Peter J., De Chiara M., Friedrich A., Yue J.-X., Pflieger D., Bergstrom A., Sigwalt A., Barre B., Freel K., Llored A., Cruaud C., Labadie K., Aury J.M., Istace B., Lebrigand K., Barbry P., Engelen S., Lemainque A., Wincker P., Liti G., Schacherer J. Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates // 2018. *Nature.* V. 556. P. 339–344.
224. Peterson S.W., Kurtzman C.P. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts // *Syst. Appl. Microbiol.* 1991. V. 14. P. 124–129.
225. Pretorius I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking // *Yeast.* 2000. V. 16(8). P. 675–729.
226. Price C.W., Fuson G.B., Phaff H.J. Genome comparison in yeast systematics: delimitation of species within the genera *Schwanyomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces* and *Pichia* // *Microbiol. Rev.* 1978. V. 42. P. 161–193
227. Puig S., Querol A., Barrio E., Pérez-Ortín J.E. Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. P. 2057–2061.
228. Pulvirenti A., Nguyen H.V., Caggia C., Giudici P., Rainieri S., Zambonelli C. *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces sensu*

- stricto // FEMS Microbiol. Lett. 2000. V. 192. P. 191–196. doi 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09381.x
229. Quoc L.P.T., Huyen V.T.N., Hue L.T.N., Hue N.T.H., Thuan N.H.D., Tam N.T.T., Thuan N.N., Duy T.H. Extraction of pectin from pomelo (*Citrus maxima*) peels with the assistance of microwave and tartaric acid // Int. Food Res. J. 2015. V. 22. P. 1637–1641.
230. Rainieri S., Kodama Y., Kaneko Y., Mikata K., Nakao Y., Ashikari T. Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. 3968–3974. doi 10.1128/AEM.02769-05
231. Rainieri S., Zambonelli C., Hallsworth J.E., Pulvirenti A., Giudici P. *Saccharomyces uvarum*, a distinct group within *Saccharomyces sensu stricto* // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 177. P. 177–185. doi 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13729.x
232. Redžepović S., Orlić S., Sikora S., Majdak A., Pretorius I.S. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards // Letters in Applied Microbiol. V. 35. P. 305–310.
233. Rodríguez M.E., Pérez-Través L., Sangorrín M.P., Barrio E., Querol A., Lopes Ch. A. *Saccharomyces uvarum* is responsible for the traditional fermentation of apple chicha in Patagonia // FEMS Yeast Res. 2017. V. 17 (1). P. fow109. doi 10.1093/femsyr/fow109
234. Rollero S., Zietsman A.J.J., Buffetto F., Schückel J., Ortiz-Julien A., Divol B. *Kluyveromyces marxianus* secretes a pectinase in Shiraz grape must that impacts technological properties and aroma profile of wine // J. Agric. Food Chem. 2018. V. 66. P. 11739–11747.
235. Rosini G., Federici F., Vaughan A.E., Martini A.. Systematics of the species of the yeast genus *Saccharomyces* associated with the fermentation industry// Eur J Appl Microbiol Biotechnol. 1982. V. 15. P. 188–193.

236. Ruan J., Cheng J., Zhang T., Jiang H. Mitochondrial genome evolution in the *Saccharomyces sensu stricto* complex // PLoS ONE. 2017. V. 12. № 8. P. e0183035.
237. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 406–425.
238. Sakai T., Sakamoto T., Hallaert J., Vandamme E.J. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications // Advances in Applied Microbiology. 1993. V. 39. P. 213–294.
239. Salvadó Z., Arroyo-López F. N., Guillamón J. M., Salazar G., Querol A., Barrio E. Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces* // App. Envir. Microbiol. 2011. P. 2292–2302.
240. Sampaio J. P., Gonçalves P. Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus* // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74(7). P. 2144–2152.
241. Sampaio J.P. Microbe Profile: *Saccharomyces eubayanus*, the missing link to lager beer yeasts // Microbiology. 2018. V. 164. P. 1069–1071. doi 10.1099/mic.0.000677
242. Sampaio J.P., Gonçalves P. Biogeography and ecology of the genus *Saccharomyces* // In Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology. 2017. P. 131–153.
243. Scannell D.R., Butler G., Wolfe K.H. Yeast genome evolution – the origin of the species // Yeast. 2007. V. 24. P. 929–942.
244. Scannell D.R., Zill O. A., Rokas A., Payen C., Dunham M. J., Eisen M. B., Rine J., Johnston M., Hittinger Ch. T. The awesome power of yeast evolutionary genetics: new genome sequences and strain resources for the *Saccharomyces sensu stricto* // G3 (Bethesda). 2011. V. 1. P. 11–25.
245. Schacherer J., Ruderfer D.M., Gresham D., Dolinski K., Botstein D., Kruglyak L. Genome-wide analysis of nucleotide-level variation in commonly used *Saccharomyces cerevisiae* strains // PLoS ONE. 2007. V. 2. P. e322.

246. Schacherer J., Shapiro J.A., Ruderfer D.M., Kruglyak L. Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae* // Nature. 2009. V. 458. P. 342–346.
247. Sceda R., Yarrow D. The instability of physiological properties used as criteria in the taxonomy of yeasts // Arch. Mikrobiol. 1966. V. 55. P. 209–225.
248. Sceda R., Yarrow D. Variation in the fermentative pattern of some *Saccharomyces* species // Archiv für Mikrobiologie. 1968. V. 61. P. 310–316.
249. Schwartz D.C., Cantor C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNA by pulsed field // Cell. 1984. V.37. P.67–75.
250. Seoighe C, Wolfe KH. Extent of genomic rearrangement after genome duplication in yeast // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 4447–4452.
251. Sherman F., Fink G. R., Hicks J.B. Laboratory course manual for methods in yeasts genetics // Gold Spring Harbor Laboratory. 1986. P. 50–51.
252. Sipiczki M. Inter species hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts // FEMS Yeast Res. 2008. V. 8. P. 996–1007.
253. Sipiczki M. Yeast two- and three-species hybrids and high-sugar fermentation // Microbial Biotechnology. 2019. V. 12(6). P. 1101–1108.
254. Souciet J.-L., Dujon B., Gaillardin C. et al. Comparative genomics of protoploid Saccharomycetaceae // Genome Res. 2009. V. 19. P. 1696–1709.
255. Spirek M., Jun Yang, Groth C., Petersen R.F., Langkjaer R.B., Naumova E.S., Sulo P., Naumov G.I., Piškur J. High-rate evolution of *Saccharomyces* sensu lato chromosomes // FEMS Yeast Res. 2003. V. 3. P. 363–373.
256. Steensels J., Gallone B., Voordeckers K., Verstrepen K. J. Domestication of industrial microbes // Curr. Biol. 2019. V. 29. P. 381–393.
257. Stelling-Dekker, N.M. Die Hefesammlung des “Centraalbureau voor Schimmelcultures”, Beiträge zu einer Monographie der Hefearten I. Teil, die sporogenen Hefen / N.M. Stelling-Dekker // Verh. K. Ned. Akad. Wet. Afd. Natuurk., Sect. II. 1931. B. 28. P.1–547.
258. Strobe P.K., Skelly D.A., Kozmin S.G., Mahadevan G., Stone E.A., Magwene P.M., Dietrich F.S., McCusker J.H. The 100–genomes strains, an *S.*

- cerevisiae* resource that illuminates its natural phenotypic and genotypic variation and emergence as an opportunistic pathogen // *Genome Res.* 2015. V. 25. P. 762–774.
259. Sun R.C., Hughes S. Fractional isolation and physiochemical characterization of alkali-soluble polysaccharides from sugarbeet pulp // *Carbohydr. Polym.* 1999. V. 54. P. 73–82.
260. Teste M.-A., François J.M., Parrou J.-L. Characterization of a new multigene family encoding isomaltases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the IMA family // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 26815–26824.
261. Tufariello M., Fragasso M., Pico J., Panighel A., Castellarin S. D., Flamini R., Grieco F. Influence of non-*Saccharomyces* on wine chemistry: a focus on aroma-related compounds // *Molecules.* 2021. V. 26. 644–666.
262. Turakainen H., Aho S., Korhola M. *MEL* gene polymorphism in the genus *Saccharomyces* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. V. 59. №. 8. P. 2622–2630.
263. Van der Walt J.P. Genus 16. *Saccharomyces* Meyen emend. Reess. // *The Yeast, a Taxonomic Study* / Ed. Lodder J. 2nd ed. Amsterdam: North-Holland Publishing Company. 1970. P. 555–718.
264. Van Rensburg, P., Pretorius, I.S. Enzymes in winemaking: harnessing natural catalysts for efficient biotransformations – a review // *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 2000. V. 21. P. 52–73.
265. Vašítk P., Sulo P., Rosenbergová Z., Klempová T., Dostálek P., Šmogrovičová D. Novel *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces mikatae* hybrids for non-alcoholic beer production // *Fermentation.* 2023. V. 9. P. 221–235.
266. Vaughan Martini A. *Saccharomyces paradoxus* comb nov, a newly separated species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex based upon nDNA/nDNA homologies// *Syst Appl Microbiol.* 1989. V. 12. P. 179–182.
267. Vaughan Martini A., Kurtzman C.P., Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces sensu stricto*// *Int J Syst Bacteriol.* 1985. V. 35. P. 508–511.

268. Vaughan Martini A., Martini A. Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*// Antonie van Leeuwenhoek. 1987. V. 53. P. 77–84.
269. Vaughan-Martini A., Martini A. *Saccharomyces* Meyen ex Reess (1870) // The Yeast, a Taxonomic Study / Eds. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. V. 2. P. 733–746.
270. Vidal S., Williams P., O'Neill M.A., Pellerin P. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides // Carbohydrate Polymers. 2001. V. 45. 315–323.
271. Wang S.A., Bai F.-Y. *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 510–514.
272. Whittaker S.G., Rockmill B.M., Blechl A.E., Maloney D.H., Resnick M.A., Fogel S. The detection of mitotic and meiotic aneuploidy in yeast using a gene dosage selection system // Mol. Gen. Genet. 1988. V. 215. № 1. P. 10–18.
273. Winge Ö., Laustsen O. On 14 new yeast types, produced by hybridization // C. R. Trav. Lab. Carlsberg Sér. Physiol. 1939. V. 22. P. 337–355.
274. Wolfe K.H., Shields D.C. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome // Nature. 1997. V. 387. P. 708–713.
275. Yamamoto K., Nakayama A., Yamamoto Y., Tabata S. Val 216 decides the substrate specificity of α -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae* // Eur. J. Biochem. 2004. V. 271. № 16. P. 3414–3420.
276. Yang F., Liu Z.-Ch., Wang X., Li L.-L., Yang L., Tang W.-Z., Yu Z.-M., Li X. Invertase Suc2-mediated inulin catabolism is regulated at the transcript level in *Saccharomyces cerevisiae* // Microbial Cell Factories. 2015. V. 14. P. 59–69.
277. Yang Y., Yu Y., Liang Y., Anderson C.T., Cao J. A profusion of molecular scissors for pectins: classification, expression, and functions of plant polygalacturonases // 2018. Front. Plant Sci. V. 9. P. 1208.
278. Yarrow D. *Zygosaccharomyces* Barker. In: The Yeasts, A Taxonomic Study, 3rd edn. (Kreger-van Rij, N.J.W., Ed.). 1984. P. 449–465.

279. Yue J.-X., Li J., Aigrain L., Hallin J., Persson K., Oliver K., Bergström A., Coupland P., Warringer J., Lagomarsino M.C., Fischer G., Durbin R., Liti G. Contrasting evolutionary genome dynamics between domesticated and wild yeasts // *Nat. Gen.* 2017. V. 49. № 6. P. 913–924.
280. Zakian V.A. Structure, function, and replication of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres// *Ann. Rev. Genet.* 1996. V. 30. P. 141–172.
281. Zhang H., Richards K.D., Wilson S., Lee S. A., Sheehan H., Roncoroni M., Gardner R. C. Genetic characterization of strains of *Saccharomyces uvarum* from New Zealand wineries // *Food Microbiol.* 2015. V. 46. P. 92–99. doi 10.1016/j.fm.2014.07.016
282. Zietsman A.J.J., Moore J.P., Fangel J.U., Willats W.G.T., Vivier M.A. Commercial yeast strains expressing polygalacturonase and glucanase unravel the cell walls of Chardonnay grape pomace // *Biology (Basel).* 2022. V. 11(5). 664.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица П1. Происхождение и пектинолитическая активность изученных штаммов дрожжей *Saccharomyces arboricola*

Штамм	Источник и место выделения	Диаметр, мм*	Номер группы
1	2	3	4
CBS 10644 (T)	Кора дуба <i>Quercus fabri</i> , Китай	3.5	1
AS 2.3319	Кора каштана <i>Castanopsis orthacantha</i> , Китай	5.0	2
AS 2.3318	Кора каштана <i>Castanopsis orthacantha</i> , Китай	8.9	2
NRRL Y-63703	Плодовое тело <i>Auricularia polytricha</i> , Тайвань	6.1	2

Таблица П2. Происхождение и пектинолитическая активность изученных штаммов дрожжей комплекса *Saccharomyces bayanus*

Штамм	Источник и место выделения	Диаметр, мм*	Номер группы
1	2	3	4
<i>Saccharomyces bayanus var. bayanus</i>			
CBS 380	Мутное пиво, Европа	14.1	3
S.b5-3A-1B	Дериват CBS380	14.1	3
CBS 1538	Пиво, Дания	13.2	3
CBS 378	Пиво, Европа	23.7	5
CBS 425	Яблочный сок, Швейцария	11.5	3
CBS 424	Грушевый сок	13.6	3
NBRC 1948	Испорченное пиво, Европа	18.7	4
<i>S. bayanus var. uvarum</i>			
CBS 7001	Ручейник <i>Mesophylax adopersus</i> , Испания	15.5	4

Sμ1-5A	Ягоды винограда, Сансер, Долина Луары, Франция	12.7	3
17e1-6B	Виноградный сок, Бордо, Франция	12.4	3
SRC258-8C	Яблочный сок, Нормандия, Франция	18.0	4
SRC274-4D	Яблочный сок, Нормандия, Франция	13.3	3
SRC306-2A	Яблочный сок, Нормандия, Франция	12.4	3
SRC410-5D	Яблочный сок, Нормандия, Франция	8.6	2
SRC55-5B	Яблочный сок, Бретань, Франция	12.7	3
CBS 431	Забродивший сок груш сорта Маркс	23.7	5
CBS 395	Сок черной смородины <i>Ribes nigrum</i> , Нидерланды	18.0	4
DBVPG 1690-5D	Виноград, Италия	12.2	3
DBVPG 1693-1D	Виноград, Италия	15.5	4
M471-2B	Виноград, Молдавия	13.9	3
M472-2A	Виноград, Молдавия	20.7	5
M477-5D	Виноград, Молдавия	18.5	4
M478-9B	Виноград, Молдавия	16.6	4
M488-10B	Виноград, Молдавия	16.4	4
M489-10A	Виноград, Молдавия	18.6	4
ВКМ Y-1146-6B	Виноград, Мичуринск, Россия	17.2	4
M300-8A	Красное вино, Ростов, Россия	11.2	3
CBS 377	Грушевое вино, Германия	15.2	4
D13-8A	Белое вино, Эльзас, Франция	15.6	4
T4/1-3B	Токайское вино, Венгрия	11.8	3
T5/6-5A	Токайское вино, Венгрия	17.0	4
T13/30-4A	Токайское вино, Венгрия	18.8	4
ВКМ Y-361-1B	Токайское вино, Словакия	17.6	4

ВКМ У-362-4В	Токайское вино, Словакия	10.9	3
ВКМ У-363-7С	Токайское вино, Словакия	15.6	4
ВКМ У-364-3С	Токайское вино, Словакия	13.9	3
ВКМ У-508-5С	Токайское вино, Словакия	15.2	4
ВКМ У-509-8С	Токайское вино, Словакия	13.1	3
М369-4А	Вино, Словакия	16.0	4
SCU 11-4А	Вино «Мюскаде», Долина Луары, Нант, Франция	16.6	4
SCU 13-1В	Вино «Мюскаде», Долина Луары, Нант, Франция	18.0	4
SCU 74-1С	Вино «Мюскаде», Долина Луары, Нант, Франция	11.1	3
SCU 197-2D	Вино «Мюскаде», Долина Луары, Нант, Франция	14.5	3
SCU 299-2D	Вино «Мюскаде», Долина Луары, Нант, Франция	11.4	3
SCU 374-5А	Вино «Мюскаде», Долина Луары, Нант, Франция	15.1	4
SCU 397-4D	Вино «Мюскаде», Долина Луары, Нант, Франция	14.2	3
CBS 8711	Вино, Долина Луары, Тур, Франция	20.1	5
SC4-2А	Шампанское, Шампань, Франция	12.7	3
IFI 369-4В	Вино, Испания	13.7	3
IFI 371-1В	Вино, Испания	12.9	3
IFI 373-6А	Вино, Испания	13.7	3
СЕСТ 10560-1-4	Вино, Испания	19.2	4
СЕСТ 1884-2А	Вино, Испания	13.3	3
СЕСТ 1369-1D	Вино, Испания	11.4	3
NCAIM У.00676-3-4	Алкогoльный напиток. Венгрия	23.8	5
NCAIM У.00677-5-2	Алкогoльный напиток. Венгрия	18.9	4
ТВVс2.95-3А	Бродящая мезга, Бордо, Сотерн, Франция	15.3	4
ТВVш3.92-3В	Бродящая мезга, Бордо, Сотерн, Франция	13.6	3

YPC2.93-5B	Бродящая мезга, Бордо, Сотерн, Франция	13.3	3
VS2.94-6B	Бродящая мезга, Бордо, Сотерн, Франция	11.8	3
PJP11.94-2A	Бродящая мезга, Поули Фюме, Франция	10.5	3
PJP1.95-7A	Бродящая мезга, Поули Фюме, Франция	10.4	3
LC1.95-2C	Бродящая мезга, Сансер, Франция	9.1	2
PJS2.95-3B	Бродящая мезга, Сансер, Франция	11.0	3
PJS1.94	Бродящая мезга, Бордо, Сотерн, Франция	0	1
DDI4.95.-4A	Бродящая мезга, Бордо, Барсак, Франция	17.5	4
136.01-1D	Экссудат вяза <i>Ulmus pumila</i> , Ботанический сад, Благовещенск, Амурская область, Россия	14.7	3
148.01-6A	Экссудат вяза <i>Ulmus pumila</i> , Благовещенск, Россия	13.9	3
CCY21-31-12	Гриб <i>Amanita citrine</i> , Словакия	11.5	3
PYCC 6330	Плодовое тело <i>Cyttaria hariotii</i> , Патагония, Аргентина	11.7	3
PYCC 7082	<i>Cyttaria</i> sp. на <i>Nothofagus dombeyi</i> , Патагония, Аргентина	14.5	3
PYCC 7083	Кора <i>Nothofagus pumillio</i> , Патагония, Аргентина	15.6	4
UWO(PS) 99-808-3-5D	Сокотечение бука <i>Nothofagus</i> sp., Патагония, Аргентина	10.7	3
LLFM11L.1 (4950)	Гнилое дерево, Луланг, Тибет, Китай	13.2	3
LZSP7L.3 (4976)	Кора <i>Juglans cathayensis</i> , Ньингчи, Тибет, Китай	12.7	3
Новозеландская популяция			
PYCC 6864	<i>Cyttaria gunni</i> на <i>Nothofagus menziesii</i> , перевал Льюиса, Новая Зеландия	13.0	3
PYCC 6865	Кора <i>Nothofagus cunninghamii</i> , Тасмания, Австралия	17.7	4
PYCC 6867-2B	Кора <i>Nothofagus solandri</i> var. <i>solandri</i> , Новая Зеландия	16.3	4
PYCC 6868	Кора <i>Nothofagus solandri</i> var. <i>solandri</i> , перевал Льюиса, Новая Зеландия	14.0	3
PYCC 6869	Кора <i>Nothofagus solandri</i> var. <i>solandri</i> , перевал Льюиса, Новая Зеландия	17.7	4

<i>Saccharomyces eubayanus</i>			
CBS 12357-2B	<i>Cyttaria hariotti</i> , Аргентина	16.6	4
PYCC 7084	<i>Cyttaria hariotti</i> на <i>Nothofagus dombeyi</i> , Аргентина	14.7	3
PYCC 7085	Кора <i>Nothofagus antarctica</i> , Аргентина	14.2	3
PYCC 7086	Почва близь <i>Nothofagus antarctica</i> , Аргентина	18.6	4
PYCC 7087	Почва близь <i>Nothofagus pumilio</i> , Аргентина	16.2	4
PYCC 7088	Почва близь <i>Nothofagus pumilio</i> , Аргентина	13.6	3
PYCC 7089	Почва близь <i>Nothofagus oblique</i> , Аргентина	13.6	3
yHKS210-2B	Кора <i>Fagus grandifolia</i> , Висконсин, США	17.1	4
yHKS211-5B	Кора <i>Fagus grandifolia</i> , Висконсин, США	17.1	4
yHKS212-7A	Кора <i>Acer saccharum</i> , Висконсин, США	14.3	3
CDSP2L.7 (4946)	Кора <i>Rosa</i> sp., Чамдо, Тибет, Китай	21.5	5
CDSP4.1 (4947)	Кора <i>Rosa</i> sp., Чамдо, Тибет, Китай	22.2	5
CDFM21L.1 (4948)	Гнилое дерево, Чамдо, Тибет, Китай	20.5	5
ABFM5L.1 (4940)	Гнилое дерево, провинция Сычуань, Китай	20.3	5
UCD650	Почва под опавшими листьями платана <i>Acer pseudoplatanus</i> , Дублин, Ирландия	Нд	-
<i>Западнокитайская популяция</i>			
LLFM15L.2 (4962)	Гнилое дерево, Луланг, Тибет, Китай	13.9	3
LZSP3L.1 (4965)	Неизвестно, Ньингчи, Тибет, Китай	18.5	4
HZZt21L.4 (4971)	Кора <i>Quercus cocciferoides</i> , провинция Шэньси, Китай	15.3	4

ТТН25L.1 (4969)	Кора <i>Quercus myrsinifolia</i> провинция Шэньси, Китай	17.6	4
LLFM12L.4 (4960)	Гнилое дерево, Луланг, Тибет, Китай	22.3	5

Таблица ПЗ. Происхождение и пектинолитическая активность изученных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Штамм	Источник и место выделения	Диаметр, мм*	Номер группы
1	2	3	4
CBS1171 (Т)	Пивоварня Ooranjeboom, Роттердам, Нидерланды	0	1
YNN 295	Генетическая линия	0	1
S288C	Генетическая линия	0	1
X 2180-1A	Генетическая линия	0	1
ВКМ Y-501	Виноград, Дальний Восток, Россия	0	1
ВКМ Y-502	Виноград, Дальний Восток, Россия	0	1
ВКМ Y-503	Виноград, Дальний Восток, Россия	0	1
ВКПМ Y-4748	Ягоды винограда, Дагестан, Россия	17.5	4
КБП Y-5095	Виноград, Дагестан, Россия	0	1
КБП Y-5009	Виноград, Дагестан, Россия	22.5	5
КБП Y-5083	Виноград, Дагестан, Россия	0	1
КБП Y-5087	Виноград, Дагестан, Россия	0	1
КБП Y-5160	Виноград, Дагестан, Россия	0	1
КБП Y-5176	Виноград, Дагестан, Россия	24.1	5
Д303	Виноград, Дагестан, Россия	0	1
Д308	Виноград, Дагестан, Россия	0	1
Д309	Виноград, Дагестан, Россия	0	1

Д310	Виноград, Дагестан, Россия	0	1
Д301	Виноград, Дагестан, Россия	0	1
Д302	Виноград, Дагестан, Россия	17.5	4
ВВ-2:1-2	Виноград, Белоруссия	0	1
КБП-3793	Виноград, Белоруссия	0	1
ВКМ У-1553-3А	Виноградная лоза, Братислава, Словакия	15.4	4
ВКМ У-1703-1-2	Сок дикого винограда <i>Vitis amurensis</i> , Дальний Восток, Россия	0	1
ВКМ У-586-4А	Клубничный сок, Дальний Восток, Россия	0	1
ВКМ У-586-5В	Клубничный сок, Дальний Восток, Россия	0	1
ВКМ У-586-2В	Клубничный сок, Дальний Восток, Россия	0	1
ВКМ У-1830-2-2	Черника, Мичуринск, Россия	0	1
ВКМ У-1753-4-2	Яблоко, Мичуринск, Россия	0	1
ВКМ У-1742-2В	Малиновый сок, Россия	0	1
ВКМ У-1752-5-1	Яблочный сок, Мичуринск, Россия	0	1
ВКМ У-1755-1D	Яблоко, Мичуринск, Россия	0	1
КБП У-4879	Абрикос, Дагестан, Россия	13.4	3
ВКМ У-1831-5-1	Бродящий яблочный сок, Мичуринск, Россия	0	1
ВКМ У-493-2С	Сброженный виноградный сок	0	1
ВКМ У-582-6-1	Забродивший сок винограда	0	1
ВКМ У-522	Сброженный сок груши	0	1
ВКМ У-436-3С	Бродящий фруктовый сок, Голландия	0	1
ВКМ У-436-3D	Бродящий фруктовый сок, Голландия	0	1
SRC 120-10В	Сидр, Бретань, Франция	0	1
SBS 7962	Бродящий сироп из сахарного тростника, Бразилия	0	1
MUCL 30909	Ферментированная маниока, Бурунди, Африка	11.4	3
ВКПМ У-718	Полиплоидный мутант штамма Кокур-3, сухое белое вино, Крым	27.0	6
КБП У-4881	Вино, Дагестан, Россия	0	1

L2-43-6D	Вино, Ялта, Россия	0	1
L2-81-7A	Вино, Ялта, Россия	0	1
M11-22-10B	Вино, Ялта, Россия	0	1
M3-33-6B	Вино, Ялта, Россия	0	1
L3-44-7C	Вино, Ялта, Россия	0	1
GIV-51	Вино, Грузия	13.9	3
GM-51	Вино, Грузия	0	1
ВКМ У-439	Вино, Грузия	0	1
M179-4A	Вино, Карпаты, Украина	0	1
M479-9B-1A	Вино, Закарпатье, Украина	0	1
M212	Шампанское, Украина	6.5	2
Харьковская 39	Шампанское, Украина	0	1
Харьковская 39-2А	Шампанское, Украина	0	1
Харьковская 39-2В	Шампанское, Украина	0	1
Харьковская 39-5В	Шампанское, Украина	0	1
Харьковская 39-5С	Шампанское, Украина	0	1
M104-3B	Вино, Франция	0	1
L579-4B	Вино, Франция	0	1
L1425-4B	Вино, Франция	0	1
ССУ 28-73-2В	Вино, Словакия	0	1
T8/11-8B	Токайское вино, Венгрия	0	1
IGC 4260-1B	Вино, Испания	0	1
СЕСТ 10432	Вино, Испания	0	1
СЕСТ 10435	Вино, Испания	0	1
SBY 1455-4B	Вино, Кадис, Испания	0	1
СЕСТ 12675	Молодое вино, Испания	0	1
СЕСТ 10016	Красное вино, Испания	0	1

CBS 4054-3B	Красное вино, Галиция, Испания	0	1
CBS 5835-5A-1B	Вино, Бадахос, Испания	0	1
СЕСТ 12664	Вино, Испания	0	1
СЕСТ1892-1B	Красное вино, Испания	0	1
СЕСТ1892-2B	Красное вино, Испания	0	1
СЕСТ 10555	Красное вино, Испания	0	1
СЕСТ 10562	Красное вино, Испания	0	1
СЕСТ 10438	Белое вино, Испания	0	1
СЕСТ 10547-3B	Белое вино, Испания	0	1
СЕСТ 12667	Белое вино, Испания	0	1
СЕСТ 12664	Белое вино, Испания	0	1
IFO 0289-3-1	Сусло китайского вина	0	1
IFO 0289-4-3	Сусло китайского вина	0	1
IFO 0290	Китайское вино	0	1
Flor B	Молодое вино, Херес-де-ла-Фронтера, Испания	0	1
SBY 2592-1B-1A	Пленка белого вина, Касерес, Испания	0	1
VI-1-1	2-я криадера, Монтийя-Морилес, Испания	0	1
VII-1-2	3-я криадера, Монтийя-Морилес, Испания	0	1
XIV-1-1	Солера, Монтийя-Морилес, Испания	0	1
XV-1-1	Солера, Монтийя-Морилес, Испания	0	1
XXIII-1-2	Молодое вино, Лусена, Испания	0	1
XVI-1-1	3-я криадера, Монтийя-Морилес, Испания	0	1
XVII-2-3	3-я криадера, Монтийя-Морилес, Испания	0	1
СЕСТ 10318	Хересное вино, Монтийя-Морилес, Испания	0	1
СЕСТ 10319	Хересное вино, Испания	0	1
СЕСТ 10323	Херес, Санлукар-де-Баррамеда, Испания	0	1
СЕСТ 11761	Херес (криадера), Испания	0	1

СЕСТ 11762	Херес (криадера), Испания	0	1
Flor H	2-я криадера, Херес-де-ла-Фронтера, Испания	0	1
СЕСТ 10638	Хересная плёнка, Испания	0	1
СЕСТ 10431	Хересная плёнка, Испания	0	1
СЕСТ 10637	Осадок хересного вина, Испания	0	1
СЕСТ 10639	Хересная плёнка, Испания	0	1
СЕСТ 10432	Хересная плёнка, Испания	0	1
СЕСТ 10435	Хересная плёнка, Испания	0	1
СЕСТ 10436	Хересная плёнка, Испания	0	1
ВКМ Y-418	Вино, Западная Африка	0	1
YO-495-2A	Винодельня «Робертсон», Южная Африка	0	1
YO-504-4D	Винодельня «Робертсон», Южная Африка	0	1
YO-614-2C	Винодельня «Робертсон», Южная Африка	0	1
CBS 2444	Винокурня, Кентуки, США	0	1
CBS 382	Пивоварня, Рио-де-Жанейро, Бразилия	0	1
CBS 1508	закваска для коньяка из сорго	0	1
CBS 1509	закваска для коньяка из сорго	0	1
CBS 1480	закваска для коньяка из сорго	0	1
DJi2-2A(a)	Пальмовое вино, Джибути	0	1
DJi2-2B(α)	Пальмовое вино, Джибути	23.8	5
CBS 2992-4-3	Пальмовое вино, Пакистан	0	1
M180-7B	Винный осадок, Ужгород, Украина	0	1
M407	Винный осадок, Ужгород, Украина	0	1
M408	Винный осадок, Закарпатье, Украина	0	1
КБП Y-4626	Виноградное сусло, Дагестан, Россия	0	1
КБП Y-4878	Виноградное сусло, Дагестан, Россия	0	1
Д6-33	Бродящее виноградное сусло, Дагестан, Россия	0	1

M427-2A	Сброженное сусло винограда, Ужгород, Украина	0	1
M412	Виноградное сусло, Ужгород, Украина	0	1
BM413	Виноградное сусло, Ужгород, Украина	0	1
M421	Виноградное сусло, Ужгород, Украина	0	1
M424	Виноградное сусло, Ужгород, Украина	0	1
M435-3D	Виноградное сусло, Карпаты, Украина	0	1
M425-4A	Виноградное сусло, Карпаты, Украина	0	1
M435-3D	Виноградное сусло, Закарпатская область, Украина	0	1
M409	Бродящее виноградное сусло, Закарпатье, Украина	0	1
M411	Бродящее виноградное сусло, Закарпатье, Украина	0	1
M419	Бродящее виноградное сусло, Закарпатье, Украина	0	1
M438	Бродящее виноградное сусло, Закарпатье, Украина	0	1
M439	Бродящее виноградное сусло, Закарпатье, Украина	0	1
M427-2A	Бродящее виноградное сусло, Ужгород, Украина	0	1
T2	Бродящее виноградное сусло, Таджикистан	0	1
T3	Бродящее виноградное сусло, Таджикистан	0	1
T10	Бродящее виноградное сусло, Таджикистан	0	1
T6-2B	Бродящее виноградное сусло, Таджикистан	0	1
T8-12B	Бродящее виноградное сусло, Таджикистан	26.8	6
T12-51	Бродящее виноградное сусло, Таджикистан	0	1
T20-2A	Бродящее виноградное сусло, Таджикистан	0	1
U23-1B	Бродящее виноградное сусло, Таджикистан	0	1
U23-11A	Бродящее виноградное сусло, Таджикистан	0	1
U23-11B	Бродящее виноградное сусло, Таджикистан	0	1
DDI27.95-2A	Бродящая мезга, Барсак, Франция	0	1
SRC120-10B	Виноградное сусло, Бретань, Франция	0	1
IGC 4387-1A	Виноградное сусло, Португалия	0	1

IGC 4586-4B	Виноградное сусло, Португалия	0	1
IGC 4591-4B	Виноградное сусло, Португалия	15.9	4
IGC 4591-4B-2B	Виноградное сусло, Португалия	15.9	4
IGC 4591-4D	Виноградное сусло, Португалия	17.6	4
IGC 4593-1B	Виноградное сусло, Португалия	0	1
IGC4540-4B	Виноградное сусло, Австрия	0	1
IGC 4541-3A	Виноградное сусло, Австрия	0	1
IGC 4544-2C	Виноградное сусло, Австрия	0	1
IGC 4546-2A	Виноградное сусло, Австрия	0	1
G16-5A	Бродящее виноградное сусло, Грузия	0	1
ВКМ Y-1554-2A	Виноградное сусло, Братислава, Словакия	15.6	4
Харьковская 39-3-1	Чаны для брожения шампанского, Харьков, Украина	0	1
N148(10)-1A	Кормовые дрожжи, Украина	0	1
IGC 4072-4C	Сухие винные дрожжи, Франция	0	1
ВКПМ Y-187	Почва, спиртовые дрожжи, Украина	0	1
ВКПМ Y-408	Спиртовые дрожжи, Москва, Россия	0	1
ВКПМ Y-480	Спиртовые дрожжи, Латвия	0	1
XII ₇	Спиртовые дрожжи, Россия	0	1
BC-2(8-2)-3B	Гидролизный завод, Россия	0	1
Д288	Почва под виноградником, Дагестан, Россия	0	1
Д289	Почва под виноградником, Дагестан, Россия	0	1
Д295	Почва под виноградником, Дагестан, Россия	0	1
Д297	Почва под виноградником, Дагестан, Россия	0	1
Д283	Почва под виноградником, Дагестан, Россия	0	1
Д298	Почва под виноградником, Дагестан, Россия	0	1
Д284	Почва под виноградником, Дагестан, Россия	0	1
Д285	Почва под виноградником, Дагестан, Россия	0	1

Д286	Почва под виноградником, Дагестан, Россия	0	1
КБП Y-5086	Почва под виноградником, Дагестан, Россия	0	1
№ 1231-5А= ВКПМ Y-93	Оливки, Испания	0	1
NRRL Y-12056-4B	Оливка	0	1
CBS 3081	Альпехин, Испания	0	1
ВКМ 1234-2D	Альпехин, Испания	0	1
ВКМ 1235-2-3	Альпехин, Испания	0	1
NRRL Y-12056-4B	Альпехин, Испания	0	1
SBY 1880-6A	Альпехин, Испания	12.3	3
SBY 1880-6B	Альпехин, Испания	0	1
SBY 1880-6C	Альпехин, Испания	7.8	2
SBY 1880-6D	Альпехин, Испания	0	1
CECT 10392-5D	Альпехин, Испания	0	1
CECT 10416-1D	Альпехин, Испания	0	1
CECT 10484-3A	Альпехин, Испания	0	1
CECT 10515-2B	Альпехин, Испания	13.6	3
CECT 10536-6-4	Альпехин, Испания	0	1
CECT 10538-4-3	Альпехин, Испания	0	1
CECT 10539-1D	Альпехин, Испания	0	1
CECT 10540-5A	Альпехин, Испания	0	1
CECT 10407-3- 1:2B	Альпехин, Испания	10.8	3
CECT 10407-3- 1:2C	Альпехин, Испания	0	1
CECT 10485-6-3	Альпехин, Испания	13.7	3
CECT 10439-4-3	Альпехин, Испания	17	4

СЕСТ 10484-3А	Альпехин, Испания	0	1
СЕСТ 10485-6-3	Альпехин, Испания	0	1
АТСС 66812-5-3-4А	Оливковые стоки, Греция	14.3	3
АТСС 66814-6-2	Оливковые стоки, Греция	0	1
ВКМ Y-1702	Сок <i>Taxus cuspidata</i> , Дальний Восток, Россия	0	1
ВКМ Y-582-6-1	Сок <i>Actinidia kolomikta</i> , Дальний Восток, Россия	0	1
N37-1А	Экссудат <i>Quercus robur</i> , Ботанический сад Новосибирск, Россия	17.2	4
N38-4А	Экссудат <i>Quercus robur</i> , Ботанический сад Новосибирск, Россия	19	4
N39-7А	Экссудат <i>Quercus robur</i> , Новосибирск, Россия	17.2	4
N51-1А	Сокотечение дуба на Дальнем Востоке, Россия	0	1
N19-1С	Экссудат дуба, Геленджик, Кавказ, Россия	0	1
UWO-PS 03-459-1-4D	Нектар пальмы <i>Bertam</i> , Малайзия	23	5
UWO-PS 03-433-3-2D	Нектар пальмы <i>Bertam</i> , Малайзия	21.2	5
UWO-PS 03-461-1-8B	Нектар пальмы <i>Bertam</i> , Малайзия	23	5
UWO-PS 05-217-3	Нектар пальмы <i>Bertam</i> , Малайзия	21.7	5
UWO-PS 83-787-3	Багамские острова	0	1
CBS 1576-3С	Растение, Индонезия	0	1
CBS 7961-2В	Продукты, Сан-Паулу, Бразилия	0	1
CBS 7961-1D	Продукты, Сан-Паулу, Бразилия	0	1
CBS 7962-4В	Продукты, Сан-Паулу, Бразилия	0	1
CBS 7962-4-4	Продукты, Сан-Паулу, Бразилия	0	1
791-Y-5B	«Эволюционный каньон», Национальный парк Маунт-Кармель, Хайфа, Израиль	0	1

81-Y-2D	«Эволюционный каньон», Национальный парк Маунт-Кармель, Хайфа, Израиль	0	1
129-Y-2C	«Эволюционный каньон», Национальный парк Маунт-Кармель, Хайфа, Израиль	0	1
ES4M07	Плодовое тело <i>Geastrum</i> sp., Наньтоу, Тайвань	0	1
SJ3L07	Листья <i>Wendlandia formosana</i> , Наньтоу, Тайвань	0	1
SJ5L09	Листья <i>Acacia dealbata</i> , Наньтоу, Тайвань	0	1
SJ6L01	Листья <i>Cunninghamia lanceolata</i> , Наньтоу, Тайвань	0	1
SJ7L01	Листья <i>Ardisia cornudentata</i> , Наньтоу, Тайвань	0	1
SJ1L04	Листья <i>Podocarpus macrophyllus</i> , Наньтоу, Тайвань	0	1
GD1M01	Плодовое тело <i>Auricularia auricular</i> , Майоли, Тайвань	0	1
GE14S01	Почва, Хуалянь, Тайвань	0	1
EN14S01	Почва, Тайвань	0	1
EN14S01-2C-3B	Почва, Тайвань	0	1
NU21L14	Листья <i>Trema orientalis</i> , Тайвань	0	1
NU21L14-1A	Листья <i>Trema orientalis</i> , Тайвань	0	1
ES2M03-7A	Плодовое тело <i>Russula</i> sp., Тайвань	0	1
NBRC 10514	Экссудат дерева, Япония	0	1
NBRC 10515	Экссудат дерева, Япония	0	1
Ksc2-2B	Экссудат деревьев, Япония	0	1
Ksc40-8A	Экссудат деревьев, Япония	0	1
Ksc73-2D	Экссудат деревьев, Япония	0	1
IFO 0877-6-1	Дуб, Япония	0	1
CCY 21-4-89:7-3	Ферментированная желудевая мука, Северная Корея	0	1
CCY 21-4-93:6B	Листья секвойи, Северная Корея	0	1
JCM 2985-4B	Ферментированная рыба, Таиланд	0	1
JCM 3529-7B	Ферментированные креветки, Таиланд	0	1

ВКПМ Y-61-5A	Фекалии свиньи, Португалия	0	1
CBS 2909-8B	Фекалии человека	0	1
CBS 2910	Фекалии человека	0	1
CECT 10403-7-5	Фекалии человека	0	1
ZP 560	<i>Quercus pyrenaica</i> , Португалия	0	1
CECT 10331-9-1	Почва виноградника, Испания	0	1
CECT 10266-2C	Дубильный раствор, Испания	16.2	4
CECT 10351-1B	<i>Lycopersicon esculentum</i> , Испания	0	1
CECT 10171-5B	Личинки <i>Dacus oleae</i> (маслинная муха), Испания	0	1
DBVPG 1622-8B	Почва, Испания	0	1
DBVPG 1616-1D	Почва, Испания	0	1
DBVPG 1617-5A	Почва, Испания	0	1
DBVPG 1620-1A	Почва, Испания	0	1
DBVPG 1619-4B	Почва, Испания	0	1
DBVPG 1621-5A	Почва, Испания	0	1
DBVPG 1623-2A	Почва, Испания	0	1
DBVPG 1340-1D	Почва, Дания	0	1
DBVPG 1793-1B	Почва, Финляндия	0	1
DBVPG 1794-4A	Почва, Финляндия	0	1
DBVPG 1788-1C	Почва, Финляндия	0	1
DBVPG 1790-7A	Почва, Финляндия	0	1
DBVPG 1789-4A	Почва, Финляндия	0	1
CBS 2888-2A	Почва, Южная Африка	0	1
C.V.11	Госпиталь, Алабама, США	0	1
95-5-1A	<i>Quercus sp.</i> , Мичиган, США	0	1
95-6-1C	<i>Quercus sp.</i> , Мичиган, США	0	1
S11F3-6A	Флоэма <i>Caryota urens</i> , Шри-ланка	0	1

S11F3-6B	Флоэма <i>Caryota urens</i> , Шри-ланка	6	2
S11F3-6D	Флоэма <i>Caryota urens</i> , Шри-ланка	11	3
S8BM-30-2D	Флоэма <i>Caryota urens</i> , Шри-ланка	0	1
S8BM-32-4C	Флоэма <i>Caryota urens</i> , Шри-ланка	0	1
I-65	Из проб спонтанно сброживаемого сусла, Таджикистан	22.1	5
I-408	Спонтанно сброженное сусло, Закарпатье, Украина	16.1	4
I-412	Спонтанно сброженное сусло, Ужгород, Украина	20.4	5
I-421	Спонтанно сброженное сусло, Ужгород, Украина	25.3	6
I-38	Из проб спонтанно сброживаемого сусла, Таджикистан	12.7	3
I-61	Из проб спонтанно сброживаемого сусла, Таджикистан	23.6	5
I-407	Спонтанно сброженное сусло, Ужгород, Украина	23.6	5
I-411	Спонтанно сброженное сусло, Закарпатье, Украина	24.2	5
I-419	Спонтанно сброженное сусло, Закарпатье, Украина	12.5	3
I-438	Спонтанно сброженное сусло, Закарпатье, Украина	26.4	6
I-439	Спонтанно сброженное сусло, Украина	19.5	4
I-40	Из проб спонтанно сброживаемого сусла, Таджикистан	22.9	5
I-409	Спонтанно сброженное сусло, Закарпатье, Украина	21.2	5
I-413	Спонтанно сброженное сусло, Ужгород, Украина	15.7	4
I-424	Спонтанно сброженное сусло, Ужгород, Украина	17.6	4
NCYC 2402	Сок флоэмы кокосового ореха, Шри-Ланка	11.8	3
ALKO 2884= CBS 2910	Фекалии человека	16.7	4
КБП У-4588	Ягоды, Дагестан, Россия	11.8	3
3.00	Виноград <i>Vitis amurensis</i> , Благовещенск, Россия	15.1	4
22.00	Плоды боярышника <i>Grataegus dachurica</i> , Благовещенск, Россия	15.6	4
АТСС 52922-4-1-1А	Рисовое вино Тапуй, Филиппины	16.7	4

159.01	Экссудат <i>Quercus mongolica</i> , Благовещенск, Россия	13.8	3
163.01	Экссудат <i>Quercus mongolica</i> , Благовещенск, Россия	12.1	3
UCDFST 61-137	<i>Drosophila pseudoobscura</i> , США	19.9	4
UCDFST 61-351	Слизетечение <i>Ulmus carpinifolia</i> , Калифорния, США	15.3	4

Таблица П4. Происхождение и пектинолитическая активность изученных штаммов дрожжей *Saccharomyces paradoxus*

Штамм	Источник и место выделения	Диаметр, мм*	Номер группы
1	2	3	4
Европейская популяция			
CBS 432-2C (T)	Кора дуба <i>Quercus</i> sp., Россия	16.2	4
CBS 406-2A	Сокотечение <i>Quercus</i> sp., Нидерланды	18.4	4
ATCC 96968	Экссудат <i>Quercus</i> sp., Финляндия	0	1
ATCC 96971	Экссудат <i>Quercus</i> sp., Финляндия	0	1
CBS 5829-4A	Лесная почва, Дания	16.8	4
CBS 7400	Испорченный майонез, Европа	11.8	3
HA 220	<i>Hypericum perforatum</i> , Австрия	13.3	3
HA219	<i>Hypericum perforatum</i> , Австрия	15.1	4
N26	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Эстония	12.2	3
N25	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Эстония	12.5	3
N27	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Эстония	12.2	3
ZP506	Кора <i>Quercus faginea</i> , Португалия	17.3	4
RO88	Виноградник, Хорватия	Нд	-
N9	Экссудат <i>Quercus</i> sp., Узбекистан	16.7	4
ВКМ Y-1707	Дикий виноград, Армения	15.1	4
ВКМ Y-1708	Полу-культурный виноград, Армения	14.0	3

N12	Сокотечения <i>Quercus</i> sp., Азербайджан	16.7	4
N14	Сокотечения <i>Quercus</i> sp., Азербайджан	11.8	3
N17-2С	Сокотечение дуба <i>Q. robur</i> , Татарстан, Россия	13.1	3
N29	Сокотечение дуба <i>Q. robur</i> , Татарстан, Россия	12.9	3
N7	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Санкт-Петербург, Россия	14.0	3
N35	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Воронеж, Россия	14.7	3
N34	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Воронеж, Россия	11.5	3
N11	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Новгородская область, Россия	14.3	3
N18	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Ефремов, Россия	11.9	3
M2	Зеленые листья брусники <i>Vaccinium vitis-doea</i> , болото, Лосиный остров, Москва, Россия	14.8	3
M22	Зеленые листья брусники <i>Vaccinium vitis-doea</i> , болото, Лосиный остров, Москва, Россия	14.2	3
M29	Зеленые листья брусники <i>Vaccinium vitis-doea</i> , болото, Лосиный остров, Москва, Россия	14.5	3
M10	Зеленые листья одуванчика <i>Taraxacum officinale</i> , луг, Лосиный остров, Москва, Россия	14.4	3
M11	Липа, лесная подстилка, Лосиный остров, Москва, Россия	12.6	3
M12	Береза <i>Betula verrucosa</i> , лесная подстилка, Лосиный остров, Москва, Россия	13.8	3
M16	Зеленая хвоя лиственницы, Лосиный остров, Москва, Россия	13.4	3
M18	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	13.1	3
M36	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	12.0	3
M42	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	11.5	3
N16	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Москва, Россия	12.2	3
M6	Зеленые листья живучки <i>Ajuga reptans</i> , лес, Лосиный остров, Москва, Россия	15.3	4

M7	Зеленые листья живучки <i>Ajuga reptans</i> , лес, Лосиный остров, Москва, Россия	15.0	4
M17	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	16.0	4
M19	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	15.2	4
M21	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	15.6	4
M23	Зеленые листья брусники <i>Vaccinium vitis-doea</i> , болото, Лосиный остров, Москва, Россия	15.2	4
M25	Зеленые листья брусники <i>Vaccinium vitis-doea</i> , болото, Лосиный остров, Москва, Россия	18.0	4
M26	Зеленые листья брусники <i>Vaccinium vitis-doea</i> , болото, Лосиный остров, Москва, Россия	15.4	4
M27	Зеленые листья брусники <i>Vaccinium vitis-doea</i> , болото, Лосиный остров, Москва, Россия	15.2	4
M28	Зеленые листья брусники <i>Vaccinium vitis-doea</i> , болото, Лосиный остров, Москва, Россия	15.4	4
M30	Зеленые листья брусники <i>Vaccinium vitis-doea</i> , болото, Лосиный остров, Москва, Россия	15.1	4
M31	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	15.5	4
M32	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	15.6	4
M40	Зеленые листья живучки <i>Ajuga reptans</i> , лес, Лосиный остров, Москва, Россия	15.0	4
M37	Зеленая хвоя лиственницы, Лосиный остров, Москва, Россия	17.8	4
N8	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Московская область, Россия	15.6	4
N13	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Московская область, Россия	11.0	3
ВКМ У-506	Поверхность свеклы, Московская область, Россия	12.2	3
N15	Сокотечения <i>Quercus robur</i> , Москва, Россия	17.8	4
N20	Сокотечения <i>Quercus robur</i> , Москва, Россия	16.9	4

N41	Сокотечения <i>Quercus</i> sp., Ялта, Крым, Россия	17.1	4
N40	Сокотечения <i>Quercus</i> sp., Ялта, Крым, Россия	17.3	4
<i>Дальневосточная популяция</i>			
D1-2B	Кора дуба, Новосибирск, Россия	13.4	3
N43-2A	Сокотечение <i>Q. mongolica</i> , Дальний восток, Россия	12.7	3
N44-1A	Сокотечение <i>Q. mongolica</i> , Дальний восток, Россия	12.5	3
NBRC 102005	Эксудат дуба <i>Quercus mongolica</i> , Дальний Восток, Россия	13.9	3
61.02-2B	Сокотечение осины <i>Populus davidiana</i> , Приморский край, Россия	13.9	3
BKM Y-505-3-2	Виноград, Дальний Восток, Россия	14.6	3
BKM Y-1704	Сок амурского винограда, Дальний Восток, Россия	13.1	3
N46	Сокотечение <i>Q. mongolica</i> , Сихотэ-Алинский заповедник, Россия	14.2	3
N48	Сокотечение <i>Q. mongolica</i> , Хасанский район, Россия	13.5	3
N49	Сокотечение <i>Q. mongolica</i> , Хасанский район, Россия	12.2	3
N50	Эксудат <i>Quercus mongolica</i> , Владивосток, Россия	13.0	3
N45	Сокотечение <i>Q. mongolica</i> , Дальний Восток, Россия	17.8	4
N47	Сокотечение <i>Q. mongolica</i> , Алинский заповедник, Россия	17.3	4
BKM Y-1697	Сок лесной малины, Дальний Восток, Россия	17.4	4
UCDFST 67-570	Эксудат растений, Япония	12.9	3
NBRC 1804	Кора дуба, Япония	11.8	3
NBRC 1805	Кора, Япония	15.2	4
RS9	Силос, Япония	Нд	-
SN-ZZ18-9	<i>Q. aliena</i> , Китай	Нд	-
HB-XS1-1	<i>Quercus</i> sp., Кита	Нд	-
HB-SNJ10a	Кора <i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	-
SN-TB12-1	<i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	-
HB-MY10-3	<i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	-
HB-XXY4-1	<i>Cyclobalanopsis myrsinifolia</i> , Китай	Нд	-

BJ-DLS32-27	<i>Q. liaotungensis</i> , Китай	Нд	-
SN-HZZ6-2	<i>Quercus cocciferoides</i> , Китай	Нд	-
SN-HZZ24-1	<i>Cyclobalanopsis jenseniana</i> , Китай	Нд	-
SN-ZZ59-1	<i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	-
JL-CB5-1	<i>Q. liaotungensis</i> , Китай	Нд	-
HB-SNJ2a	Кора <i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	-
SN-TTH1-1	<i>Q. cocciferoides</i> , Китай	Нд	-
HB-XS18-1	<i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	-
SN-ZZ32-3	<i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	-
JL-WQ14-1	<i>Q. liaotungensis</i> , Китай	Нд	-
JL-CB13-1	Гнилое дерево, Китай	Нд	-
SN-TTS3-10	<i>Cyclobalanopsis jenseniana</i> , Китай	Нд	-
HB-XS3-1	<i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	-
HB-XS21-2	<i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	-
BJ-DLS2-1	<i>Corylus heterophylla</i> , Китай	Нд	-
BJ-DLS32-26	<i>Q. liaotungensis</i> , Китай	Нд	-
SN-QL4-2	<i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	-
HB-MY15-2	<i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	-
BJ-DLS60-3	<i>Q. liaotungensis</i> , Китай	Нд	-
SN-HZZ1-1	<i>Corylus mandshurica.</i> , Китай	Нд	-
XZ-98-1-1	<i>Juglans cathayensis</i> , Тибет, Китай	Нд	-
Североамериканская популяция			
95-1-5A	Сокотечение <i>Quercus</i> sp., Мичиган, США	13.5	3
95-3	Дуб <i>Q. alba</i> , Мичиган, США	22.9	5
95-4	Дуб <i>Q. rubra</i> , Мичиган, США	11.9	3
95-7	Дуб <i>Q. rubra</i> , Мичиган, США	13.8	3
UCDFST 72-129	Сокотечения <i>Q. gambelii</i> , Аризона, США	15.0	4

UCDFST 61-196	<i>Drosophila pseudoobscura</i> , Калифорния, США	14.3	3
UCDFST 61-248	<i>Drosophila pseudoobscura</i> , Калифорния, США	18.8	4
UCDFST 51-186	<i>Drosophila pseudoobscura</i> , Калифорния, США	17.7	4
UCDFST 52-153-1B	<i>Drosophila</i> sp., Калифорния, США	17.4	4
UCDFST 51-137	<i>Drosophila Azteca</i> , Калифорния, США	15.9	4
UCDFST 61-232	<i>Drosophila viridis</i> , Калифорния, США	16.1	4
UCDFST 52-225	Насекомые <i>Aulacigaster</i> sp., Калифорния, США	20.2	5
UCDFST 61-359	Сокотечения <i>Ulmus carpinifolia</i> , Калифорния, США	22.4	5
UCDFST 61-220	Насекомые <i>Aulacigaster</i> sp., Калифорния, США	25.4	6
UCDFST 69-1006	Ива (<i>Salix</i> sp.), Калифорния, США	15.2	4
UCDFST 79-128	Черёмуха <i>Prunus virginiana</i> , Онтарио, Канада	13.5	3
UCDFST 79-140	Яблоня <i>Malus pumila</i> , Онтарио, Канада	11.0	3
UCDFST 62-186	Осиное гнездо, Канада	27.4	6
Гавайская популяция			
UCDFST 72-145	Экссудат <i>Myoporum</i> sp., Гавайи, США	13.8	3
UCDFST 73-538.2	Экссудат растений, Гавайи, США	14.6	3
UCDFST 72-140	Экссудат <i>Myoporum sandwicense</i> с личинками <i>Drosophila heidi</i> , Гавайи, США	0	1
UCDFST 71-101	Экссудат <i>M. sandwicense</i> , Гавайи, США	0	1
UCDFST 72-143	Экссудат <i>M. sandwicense</i> , Гавайи, США	0	1
UCDFST 72-149-5A	Экссудат <i>M. sandwicense</i> , Гавайи, США	0	1
UCDFST 72-149-5B	Экссудат <i>M. sandwicense</i> , Гавайи, США	0	1
UWO (PS) 91-917.1-5A	Экссудат <i>M. sandwicense</i> , Гавайи, США	0	1

Таблица П5. Происхождение и пектинолитическая активность изученных штаммов дрожжей *Saccharomyces cariocanus*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*

Штамм	Источник и место выделения	Диаметр, мм*	Номер группы
1	2		
<i>S. cariocanus</i>			
UFRJ 50816 (T)	<i>Drosophila</i> sp., Бразилия	11.8	3
UFRJ 50791	<i>Drosophila</i> sp., Бразилия	14.6	3
<i>S. jurei</i>			
CBS 14759 (T)	Кора дуба <i>Q. robur</i> , Франция	17.2	4
NCYC 3962	Кора дуба <i>Q. robur</i> , Франция	14.7	3
ВКМ Y-3330	Почва, Дагестан, Россия	17.3	4
<i>S. kudriavzevii</i>			
NBRC 1802 (T)	Гниющие листья, Япония	5.0	2
NBRC 1803	Гниющие листья, Япония	12.5	3
NBRC 10991	Гниющие листья, Япония	0	1
NBRC 10990	Почва, Япония	7.8	2
РУСС 5979	Кора дуба <i>Quercus</i> sp., Португалия	6.1	2
РУСС 5977	Кора дуба <i>Quercus</i> sp., Португалия	6.7	2
ВКПМ Y-4736	Кора дуба <i>Quercus</i> sp., Португалия	8.5	2
РУСС 5978	Дуб <i>Q. pyrenaica</i> , Португалия	Нд	-
SR85	Дуб, Испания	Нд	-
TJ13M05	<i>Bolbitius</i> sp., Хуалянь, Тайвань	5.0	2
NRRL Y-63706	Почва, Хуалянь, Тайвань	8.9	2
ES14S09	Почва, Наньтоу, Тайвань	9.9	2
TJ11S04	Почва, Хуалянь, Тайвань	10.9	3
NRRL Y-63705	Почва, Гаосюн, Тайвань	11.1	3

NRRL Y-63704	Листья <i>Eupatorium tashiroi</i> , Гаосюн, Тайвань	10.7	3
РУСС 5978	Кора <i>Quercus pyrenaica</i> , Португалия	Нд	-
уНКС 300	<i>Quercus</i> sp., Европа	Нд	-
<i>S. mikatae</i>			
NBRC 1815 (Т)	Почва, Япония	5.0	2
NBRC 10996	Почва, Япония	6.0	2
NBRC 10999	Почва, Япония	8.1	2
NBRC 1816	Опавшие листья, Япония	5.0	2
NBRC 11000	Сокотечение <i>Q. crispula</i> , Япония	12.7	3
NBRC 11001	Сокотечение <i>Camellia japonica</i> , Япония	5.0	2
NBRC 11002	Сокотечение <i>Fagus crenata</i> , Япония	7.0	2
NBRC 11003	Сокотечение <i>Q. myrsinaefolia</i> , Япония	10.9	3
NBRC 10992	Опавшие листья, Япония	11.5	3
NBRC 10993	Опавшие листья, Япония	12.3	3
NBRC 10995	Опавшие листья, Япония	12.4	3
NBRC 10997	Опавшие листья, Япония	13.1	3
NBRC 10998	Опавшие листья, Япония	13.5	3
NBRC 10994	Опавшие листья, Япония	14.9	3

*Диаметр зоны гидролиза полигалактуроновой кислоты вокруг колоний дрожжей на РG-среде, мм. Нд – нет данных.

Таблица П6. Происхождение и α -глюкозидазы изученных штаммов дрожжей

Штамм	Вид	Источник выделения	α -Глюкозидазы (IMA, MAL)	Название белка или регистрационный номер в GenBank
<i>Saccharomyces</i>				
CBS 10644 (H-6)	<i>S. arboricola</i>	Кора <i>Quercus fabri</i> , Китай	IMA5	EJS44461.1
S 288C	<i>S. cerevisiae</i>	Генетическая линия	IMA1	YGR287C
			IMA2	YOL157C
			IMA3	YIL172C
			IMA4	YJL221C
			IMA5	YJL216C
			MAL32	YBR299W
			MAL12	YGR292W
UFRJ 50816	<i>S. cariocanus</i>	<i>Drosophila</i> sp., Бразилия	IMA5	CP020301.1
			IMA5	CP020302.1
			MAL	CP020299.1
CBS 7001	<i>S. bayanus</i>	Ручейник <i>Mesophylax adopersus</i> , Испания	MAL	CM034485.1
			MAL	CM034493.1
CBS 432	<i>S. paradoxus</i>	Кора дуба <i>Quercus</i> sp., Россия	IMA5	XP_033767088.1
			MAL	XP_033766624.1
NBRC 1815	<i>S. mikatae</i>	Почва, Япония	IMA5	AACH01000169.1
			MAL	AACH01000114.1
			MAL	AACH01000018.1
CR85	<i>S. kudriavzevii</i>	Дуб, Испания	IMA5	CP030968.1
			MAL	CP030975.1
			MAL	CP030968.1
CBS 14759	<i>S. jurei</i>	Кора дуба <i>Q. robur</i> , Франция	IMA5	LT986472.1
			IMA5	LT986472.1
			MAL	LT986469.1
			MAL	LT986468.1
<i>Kluveromyces</i>				
NRRL Y-1140	<i>K. lactis</i>	Сливки, США	MAL	KLLA0D00231p
			MAL	KLLA0_B00242g
CBS 2104	<i>K. dobzhanskii</i>	<i>Drosophila pseudoobscura</i> , США	MAL	CDO93416.1
<i>Lachancea</i>				
CBS	<i>L.</i>	Листья	IMA	LADA_0G16754g1_1

10888	<i>dassiensis</i>	папоротника <i>Angiopterisly godiifolia</i> , Тайвань	IMA	LADA_0F00320g1_1
			MAL	LADA_0G16688g1_1
CBS 6924	<i>L. fantastica</i>	Почва, Южная Африка (Претория)	IMA	Lafa_0F00782g1_1
			MAL	Lafa_0E00188g1_1
			MAL	Lafa_0D17568g1_1
CBS 6772	<i>L. fermentati</i>	Безалкогольные напитки, Южная Корея	IMA	Lafe_0G01134g1_1
			IMA	Lafe_0A00254g1_1
			MAL	Lafe_0G01090g1_1
CBS 3082	<i>L. kluyveri</i>	<i>Drosophila pinicola</i> , США	IMA	SAKLOA00154p
			IMA	SAKLOC00176p
			MAL	SAKLOA05698p
			MAL	SAKLOA05654p
			MAL	SAKLOC02112p
CBS 6340	<i>L. thermotolerans</i>	Кондитерские изделия, консервы Мирабель, Россия	IMA	KLTH0B00308p
			MAL	KLTH0E17006p
			MAL	KLTH0G19470p
			MAL	KLTH0H05324p
CBS 8951	<i>L. meyersii</i>	Морская вода (мангровые заросли), Багамские острова	IMA	LAME0A00232g1_1
			MAL	LAME0D11342g1_1
			MAL	LAME0C08394g1_1
CBS 11611	<i>L. nothofagi</i>	Сокотечение <i>Nothofagus</i> , Аргентина	IMA	LANO0G18272g1_1
			MAL	LANO0F01354g1_1
CBS 11717	<i>L. mirantina</i>	Кашаса («Бразильский ром»), Бразилия	IMA	LAMI0F07580g1_1
			MAL	LAMI0B00122g1_1
CBS 12615	<i>L. lanzarotensis</i>	Виноград, Канарские острова, Испания	IMA	LALA0S01e00672g
			MAL	LALA0_S01e19174g
			MAL	LALA0S13e02894g
CBS 14138	<i>L. quebecensis</i>	Кора клёна, Канада	IMA	LAQU0S17e02674g1_1
			MAL	LAQU0S06e05864g1_1
			MAL	LAQU0S02e00122g1_1
			MAL	LAQU0S02e11166g1_1
<i>Debaryomyces</i>				
CBS 767	<i>D. hansenii</i>	Неизвестно	MAL	DEHA2A13882p
			MAL	DEHA2E00528p
<i>Scheffersomyces</i>				

CBS 6054	<i>Schef. stipitis</i>	Фруктовые деревья, личинки насекомых, Франция	MAL	ABN67312.1
			MAL	ABN67767.1
			MAL	ABN66628.1
			MAL	ABN64883.1
<i>Schizosaccharomyces</i>				
CBS 7264	<i>Schi. pombe</i>	Виноградный сок, Швеция	MAL	NP_595063.1

Сокращенные названия коллекций: ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов (Пушино, Россия); ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (Москва, Россия); КБП – Коллекция кафедры биологии почв МГУ (Москва, Россия); М – Коллекция микроорганизмов виноделия «Магарач» (КМВ «Магарач»), ФГБУН ВНИИВиВ «Магарач» РАН (Ялта, Россия); АТТС – American Type Culture Collection (Манассас, США); CBS – The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Утрехт, Нидерланды); СЕСТ – Spanish Type Culture Collection, University of Valencia (Валенсия, Испания); MUCL – Mycothèque de L'Université, Catholique de Louvain (Лёвен, Бельгия); NBRC/IFO – National Institute of Technology and Evaluation (Токио, Япония); NCAIM – National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (Будапешт, Венгрия); NCYC – National Collection of Yeast Cultures (Норидж, Великобритания); PYCC – Portuguese Yeast Culture Collection (Лиссабон, Португалия); SRC – The Yeast Collection of Station de Recherche Cidricoles (Ле-Рё, Франция); UCDFST – Herman J. Phaff Yeast Culture Collection of the Department of Food Science and Technology, University of California (Дэвис, Калифорния, США); UFRJ – Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Бразилия); UWO (PS) – Culture collection of the Department of Biology, University of Western Ontario (Онтарио, Канада); D13, TBV1c2.95, DDI27.95, DDI4.95.4A – штаммы из коллекции Institut des Sciences De la Vigne et du Vin (ISVV) (Вильнав-д'Орнон, Франция); ES4M07, SJ3L07, SJ5L09, SJ6L01, SJ7L01, SJ1L04, GD1M01, GE14S01, EN14S01, EN14S01-2C-3B, NU21L14, NU21L14-1A, ES2M03-7A, TJ13M05, ES14S09, TJ11S04 – штаммы из коллекции Dr. Ch.F. Lee, Department of Applied Science, National Tsing Hua University (Синьчжу, Тайвань). Остальные штаммы из коллекции лаборатории молекулярной генетики дрожжей ФГБУ «ГосНИИгенетика НИЦ «Курчатовский институт» (Москва, Россия). Соответствия некоторых номеров коллекций: M472-2A=CBS 8690; VKM Y-436-3C=CBS 1544; SBY 1455-4B=CBS 6006; SBY 2592-1B-1A=CBS 4093; VKM Y-418=CBS 405; СЕСТ 10439-4-3=CBS 7002; N51-1A=ВКПМ Y-1455; ВКПМ Y-61-5A=CBS 4411; S μ 1-5A=SG1.95; H118-2A=CCY21-31-12; PYCC 7082 = CRUB1586; PYCC 7083= CRUB1778; СЕСТ 10318= CBS 6203; ALKO 2884= CBS 2910; GIV51 = ВКПМ Y-388; GM 51 = ВКПМ Y-391; CBS 8711 = L19-1A; NBRC 102005 = N42-1B; VKM Y-3330 = КБП 5787; N9=ATCC 96886; CBS 14759= NCYC 3947.