

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

на правах рукописи

Боровкова Алена Николаевна

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

Специальности 1.5.18 – Микология,
1.5.7 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

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

**Научные
руководители:**

Наумова Елена Сергеевна, доктор биологических наук, профессор

Шнырева Алла Викторовна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник

**Официальные
оппоненты:**

Калбина Татьяна Сергеевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Мироненко Нина Васильевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунитета растений к болезням ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений»

Максимова Ирина Аркадьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится « 17 » мая 2024 г. в 15 часов 35 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.6 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, аудитория М-1.

E-mail: dissovet_00155@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/2974>

Автореферат разослан « » апреля 2024 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Д.М. Гершкович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности.

На протяжении многих веков человечество использует дрожжи *Saccharomyces* для хлебопечения, пивоварения, виноделия и производства спирта. Культурный генофонд дрожжей рода *Saccharomyces* представлен видами *S. cerevisiae* и *S. bayanus*, используемыми в промышленных ферментациях. Виды *S. arboricola*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii* и *S. jurei* не связаны с хозяйственной деятельностью человека и встречаются преимущественно в природе (Kurtzman et al., 2011; Naseeb et al., 2017). 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* (Nikulin 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; Bendixsen et al., 2022). В этой связи перспективным является поиск штаммов-сахаромицетов, обладающих важными для различных ферментационных процессов характеристиками.

Важным свойством винных дрожжей является способность расщеплять содержащиеся в ягодах винограда пектиновые вещества, высокое содержание которых затрудняет процесс отделения и осветления виноградного сусла, 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 (эндополигалактуроноза, 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 обнаружена у шампанского штамма *S. bayanus* (Gognies et al., 1999; Naumov et al., 2001a). Показано, что дрожжи *S. bayanus* обладают тремя пектиназными генами *PGU* (Наумов и др., 2016a, b; 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 имеет холодоустойчивый вид *S. bayanus*. Растущий интерес к изучению этих дрожжей связан с их возможной ролью в качестве одного из донорских родительских геномов пивных дрожжей *S. pastorianus*. Комплексный вид *S. bayanus* представлен двумя разновидностями: *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. bayanus* var. *ivarum* (Наумов, 2000; Vaughan-Martini, Martini, 2011). Некоторые авторы возводят их в ранг отдельных видов: *S. bayanus* и *S. ivarum* (Nguyen, Gaillardin, 2005; Rainieri et al., 2006). Другие предлагают упразднить вид *S. bayanus* как “неправильный”, содержащий чужеродные последовательности *S. cerevisiae*, и восстановить таксономически “чистый” вид *S. ivarum* (Rainieri et al., 1999; Nguyen et al., 2000; Nguyen, Gaillardin, 2005). Родственные дрожжи *S. eubayanus* были описаны на изолятах из Аргентины, а позднее обнаружены в Китае, США,

Канаде, Австралии, Новой Зеландии и недавно в Европе (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 дрожжей *S. eubayanus* выявило их большое сходство с холодоустойчивым родителем европейских пивных дрожжей *S. pastorianus* (Baker et al., 2015; Sampaio, 2018). Еще больше усложнило понимание таксономического статуса вида *S. bayanus* обнаружение в Новой Зеландии и Западном Китае штаммов, значительно отличающихся от *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *ivarum* и *S. eubayanus* по ряду молекулярных маркеров (Almeida et al., 2014; Bing et al., 2014).

Наиболее изменчивыми участками генома дрожжей *Saccharomyces* являются субтеломерные районы хромосом, в которых расположены гены ферментации различных сахаров и пектиназные гены *PGU*, контролирующие расщепление пектина (Mortimer et al., 1992; Cliften et al., 2001; Kellis et al., 2003). Способность ферментировать мальтозу и изомальтозу важна для пекарских, пивных и спиртовых дрожжей *S. cerevisiae*. В геноме генетической линии *S. cerevisiae* S288C имеются два α -глюкозидазных гена *MAL12* и *MAL32* ферментации мальтозы и пять генов *IMA1–IMA5*, отвечающих за ферментацию α -метилглюкозида и изомальтозы (Наумов, Наумов, 2010; Brown et al., 2010; Teste et al., 2010). Однако происхождение α -глюкозидаз *IMA* и *MAL* дрожжей *Saccharomyces* остается неясным.

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

Цель и задачи исследования. 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.

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 *Kluveromyces*, 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 *Kluveromyces*.

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 эндо-полигалактуроназу и представляющие интерес для дальнейших исследований и селекционных работ с винными дрожжами.

Методология и методы исследования. В работе использованы микробиологические, молекулярные и генетические методы. Культивирование дрожжей, индуцирование споруляции, отбор ауксотрофных мутаций, получение гибридов и тетрадный анализ проводили согласно стандартным методикам (Захаров и др., 1984).

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 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 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 «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.

Объем и структура диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 4 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Список литературы включает 282 источника. Общий объем диссертации – 214 страниц. Диссертация содержит 36 рисунков и 4 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе приведены литературные данные по систематике дрожжей рода *Saccharomyces* и рассмотрены их физиологические характеристики, важные для различных ферментационных процессов. Приводится обзор литературы по эволюции видов рода *Saccharomyces*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Изучено 575 штаммов дрожжей *Saccharomyces*, 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.

Методы исследования. Скрининг на наличие пектинолитической активности осуществляли согласно Louw et al. (2010) в нашей модификации. ДНК выделяли согласно Løoke et al. (2011). Амплификацию генов проводили на ДНК-амплификаторе “Bio-Rad” (США). ПЦР-амплифицированные фрагменты элюировали из геля с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США). Филогенетические деревья строили кладиристическим методом объединения соседей (Neighbor-Joining) в программе MEGA 10 (Kumar et al., 2018).

Электрофоретическое разделение препаратов хромосомных ДНК проводили на аппарате CHEF-DR III фирмы “Bio-Rad” (США) согласно методике Наумовой и др. (1993). Перенос хромосомных ДНК на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли вакуумным методом на аппарате “Vacuum blotter” (“Bio-Rad”, США). Для мечения ДНК применяли нерадиоактивную метку с использованием набора “DIG High Prime DNA Labeling Detection Starter Kit I” (“Roche”, Швейцария).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

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

Проведена молекулярная реидентификация 13 коллекционных штаммов, видовая принадлежность которых ранее была определена стандартными таксономическими методами. Видовая принадлежность подтверждена для одного штамма *S. cerevisiae* и трех *S. paradoxus*. Идентифицированы новые штаммы *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, межвидовой гибрид *S. cerevisiae* × *S. paradoxus*, а также редкий вид *S. jurei*. Показано, что с помощью ПДРФ-анализа ITS1-5.8S-ITS2-участка рДНК с использованием эндонуклеазы *Bgl*II можно дифференцировать вид *S. jurei*.

С помощью молекулярного кариотипирования и мультигенного филогенетического анализа изучено генетическое родство дрожжей вида *S. jurei* и остальных видов рода *Saccharomyces*. Мультигенный анализ показал, что вид *S. jurei* филогенетически наиболее близок к виду *S. mikatae*, тогда как виды *S. bayanus* и *S. arboricola* являются наиболее дивергентными видами в пределах рода *Saccharomyces* (рис. 1). Анализ аминокислотных последовательностей β-фруктозидазных генов *SUC* также указывает на близкое генетическое родство видов *S. jurei* и *S. mikatae*.

Впервые проведен кариотипический анализ дрожжей *S. jurei* (рис. 2). У вида *S. jurei* отсутствуют две нижние полосы, по размерам соответствующие хромосомам I (245 т.п.н.) и VI (290 т.п.н.) контрольного штамма *S. cerevisiae* YNN 295 (рис. 2а,

дорожки 17–19 и 1). Хромосома размером около 290 т.п.н. также отсутствует у штаммов *S. bayanus* var. *ivarum* и *S. mikatae* (рис. 2а, дорожки 11, 12 и 15, 16).

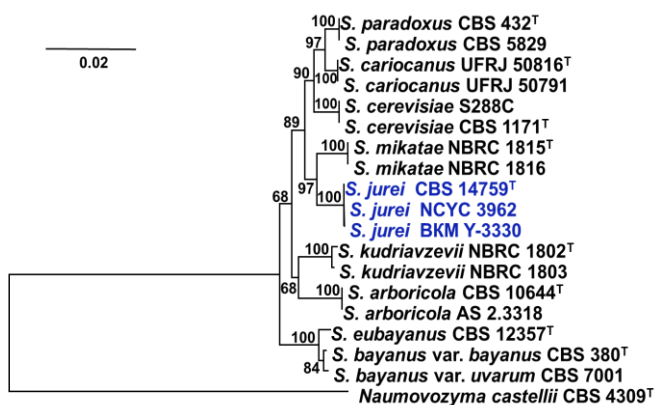


Рис. 1. Мультигенный филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 18S рРНК, домена D1/D2 гена 26S рРНК, 5.8S-ITS-участка, ядерного гена *ACT1* и митохондриального гена *ATP9* дрожжей рода *Saccharomyces*. В качестве внешней группы использовали типовую культуру *Naumovozyma castellii* CBS 4309. Шкала соответствует 20 нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. Приводятся значения бутстрепа >70%. Т – типовая культура. Синим цветом выделены штаммы, нуклеотидные последовательности которых определены в данной работе.

С помощью Саузерн-гибридизации с тремя зондами *S. cerevisiae* (локус *ADE1* на хромосоме I, *ACT1* на хр. VI и *TRP5* на хр. VII) в молекулярном кариотипе вида *S. jurei* обнаружены две реципрокные транслокации. Одна из них – уникальная и затрагивает хромосомы I и XIII (рис. 2б, дорожки 17–19), а другая транслокация, между хромосомами VI и VII, встречается также в геноме вида *S. mikatae* (рис. 3б).

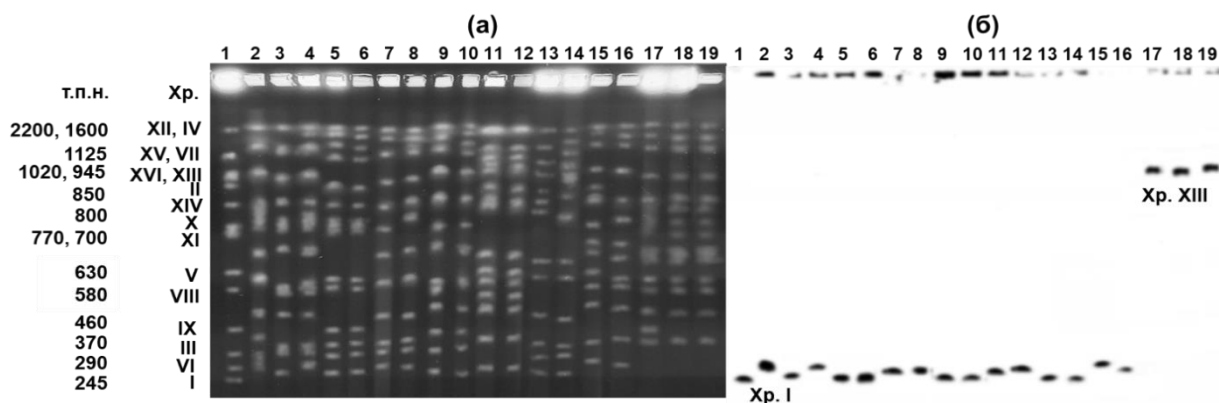


Рис. 2. Пульс-электрофорез (а) и Саузерн-гибридизация (б) хромосомных ДНК дрожжей рода *Saccharomyces* с зондом *ADE1* *S. cerevisiae*. Дорожки: *S. cerevisiae*: 1 – YNN 295, 2 – S288C; *S. paradoxus*: 3 – CBS 432, 4 – NBRC 1804; *S. cariocanus*: 5 – UFRJ 50791, 6 – UFRJ 50816; *S. arboricola*: 7 – CBS 10644, 8 – AS 2.3318; *S. kudriavzevii*: 9 – NBRC 1802, 10 – NBRC 1803; *S. bayanus* var. *ivarum*: 11 – CBS 7001, 12 – BKM 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 – BKM Y-3330.

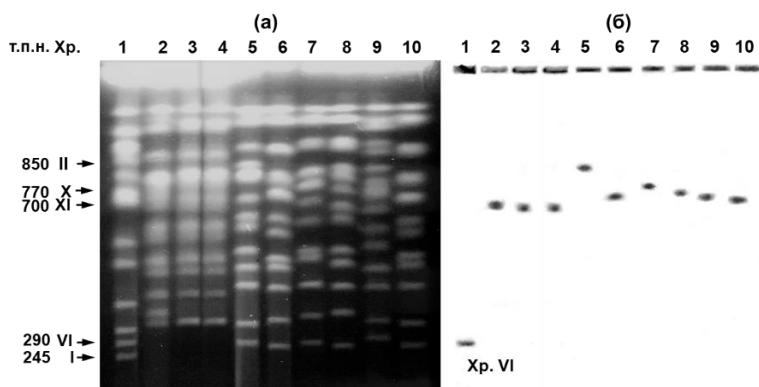


Рис. 3. Пульс-электрофорез (а) и Саузерн-гибридизация (б) хромосомных ДНК дрожжей *Saccharomyces jurei* и *S. mikatae* с зондом *ACT1* *S. cerevisiae*. Дорожки: *S. cerevisiae*: 1 – YNN 295; *S. jurei*: 2 – NCYC 3947, 3 – NCYC 3962, 4 – BKM Y-3330; *S. mikatae*: 5 – NBRC 1815, 6 – NBRC 1816, 7 – NBRC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

2. ВНУТРИВИДОВОЙ ПОЛИМОРФИЗМ БИОЛОГИЧЕСКОГО ВИДА *SACCHAROMYCES BAYANUS*

С помощью различных молекулярных методов и гибридологического анализа изучено генетическое родство 45 штаммов комплексного вида *S. bayanus*.

ПДРФ-анализ амплифицированных IGS2-фрагментов рДНК с рестриктазой *AluI*. По размеру и количеству *AluI*-фрагментов штаммы *S. bayanus* разделились на пять групп. Первую группу составили дрожжи *S. bayanus* var. *ivarum* (рис. 4 дорожки 9–18). Вторая представлена штаммами *S. eubayanus* и *S. bayanus* var. *bayanus* (CBS 378, CBS 424, CBS 425, NBRC 1948) (дорожки 5–8 и 24–29). В третью группу вошли штаммы, изолированные в Австралии и Новой Зеландии (NZ), у которых присутствует средний фрагмент размером 500 п.н. (дорожки 19–23). В *AluI*-профиле штамма *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 380 и его моноспоровой культуры S.b.5-3A-1B объединены фрагменты var. *bayanus*-типа и var. *ivarum*-типа (дорожки 3, 4). У западнокитайских штаммов выявлено два *AluI*-профиля: WCh1 (штаммы 4962 и 4965, дорожки 30 и 31) и WCh2 (штаммы 4969, 4971, 4960, дорожки 32–34).

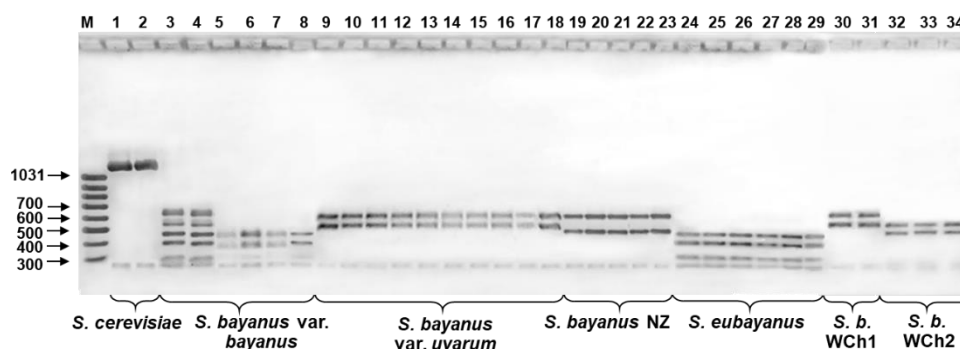


Рис. 4. Рестрикционный анализ амплифицированных фрагментов межгенного спейсера IGS2 штаммов *Saccharomyces* с помощью эндонуклеазы *AluI*. Дорожки: *S. cerevisiae*: 1–2; *S. bayanus* var. *bayanus*: 3–8; *S. bayanus* var. *ivarum*: 9–18; *S. bayanus* NZ: 19–23; *S. eubayanus*: 24–29; *S. bayanus* WCh1: 30–31; *S. bayanus* WCh2: 32–34. М – маркер молекулярных весов (п.н.) “100bp DNA Ladder” (“Fermentas”, Литва).

Мультигенный филогенетический анализ. Мы провели сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей ITS1-участка, трех ядерных (*FSY1*, *HIS3*, *MET2*) и двух митохондриальных (*FUN14*, *COX2*) генов. На филогенетическом дереве выделяются три кластера (рис. 5). Первый включает два подкластера, соответствующие *S. eubayanus* и *S. bayanus* var. *bayanus*; отдельное положение занимает штамм *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 378. Европейский штамм *S. eubayanus* UCD650 филогенетически наиболее близок к тибетским штаммам. Второй кластер представлен западнокитайской популяцией, штаммы которой значительно отличаются по всем молекулярным маркерам: >57 нуклеотидных замен в гене *FSY1*, >17 замен в гене *MET2*, >27 замен в гене *HIS3*, >19 замен в гене *FUN14* и >21 замены в гене *COX2*. Западнокитайские штаммы не способны сбраживать мелибиозу и обладают псевдогенами: *mel1*⁰ (штаммы 4962, 4960, 4969) и *mel2*⁰ (штаммы 4965, 4971). Третий кластер также подразделен на два подкластера, соответствующие новозеландской популяции (NZ) и разновидности *S. bayanus* var. *ivarum*, к которой примыкает штамм *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 425. Новозеландские штаммы отличаются от *S. bayanus* var. *ivarum* по нуклеотидным последовательностям всех пяти генов: 55–56 замен в гене *FSY1*, 16–18 в гене *MET2*, 24–26 в гене *HIS3*, 21 в гене *FUN14* и 43–46 в гене *COX2*.

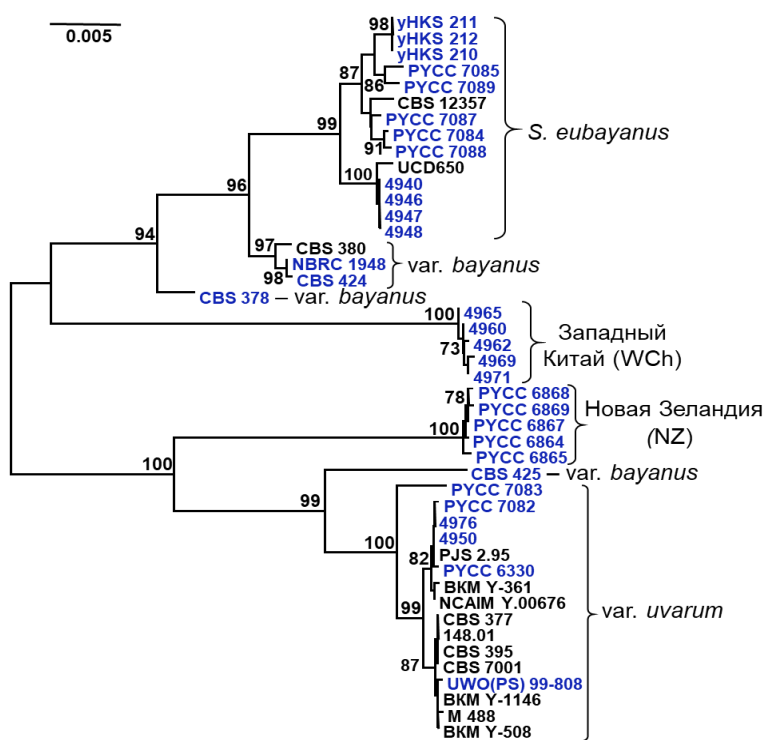


Рис. 5. Филогенетический анализ ITS1-района, ядерных (*FSY1*, *HIS3*, *MET2*) и митохондриальных (*FUN14*, *COX2*) генов дрожжей комплекса *Saccharomyces bayanus*. Приводятся значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует пяти нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. Синим цветом выделены штаммы, нуклеотидные последовательности которых определены в данной работе.

Штаммы *S. bayanus* var. *bayanus* попали в два разных кластера: с разновидностью *S. bayanus* var. *uvarum* и дрожжами *S. eubayanus* (рис. 5).

Молекулярное кариотипирование и Саузерн-гибридизация. Кариотипы штаммов *S. eubayanus*, новозеландской и западнокитайской популяций обладают тремя хромосомными полосами размером 245–370 т.п.н. вместо двух у *S. bayanus* var. *uvarum* (рис. 6а, дорожки 7–9, 12–15, 16–20, 10 и 11). Штаммы разновидности *S. bayanus* var. *bayanus* отличались по кариотипам: CBS 380, CBS 424 и CBS 425 имели три хромосомные полосы размером 245–370 т.п.н., тогда как штаммы NBRC 1948 и CBS 378 – одну и две хромосомные полосы (рис. 6а, дорожки 2–4, 6 и 5).

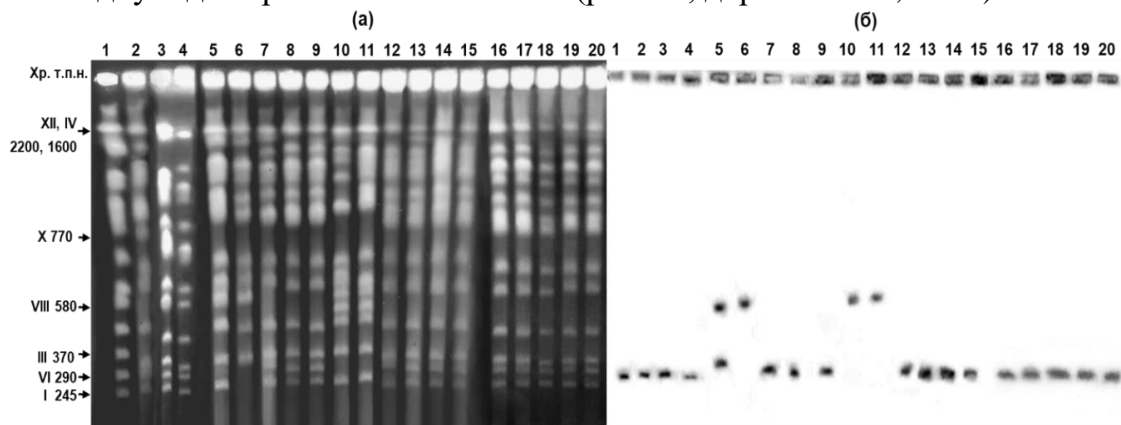


Рис. 6. Пульс-электрофорез (а) и Саузерн-гибридизация (б) хромосомной ДНК дрожжей комплекса *Saccharomyces bayanus* с зондом *ACT1* дрожжей *S. cerevisiae*. Дорожки: *S. cerevisiae*: 1 – YNN 295; *S. bayanus* var. *bayanus*: 2 – CBS 380, 3 – CBS 424, 4 – CBS 425, 5 – CBS 378, 6 – NBRC 1948; *S. eubayanus*: 7 – CBS 12357, 8 – уНКС210, 9 – РУСС 7086; *S. bayanus* var. *uvarum*: 10 – CBS 7001, 11 – CBS 395; новозеландская популяция *S. bayanus*: 12 – РУСС 6864, 13 – РУСС 6867, 14 – РУСС 6868, 15 – РУСС 6869; западнокитайская популяция *S. bayanus*: 16 – 4960, 17 – 4962, 18 – 4965, 19 – 4969, 20 – 4971.

У штаммов *S. eubayanus*, новозеландской и западнокитайской популяций и трех штаммов *S. bayanus* var. *bayanus* (CBS 380, CBS 424 и CBS 425) зонд *ACT1* (хромосома VI) дрожжей *S. cerevisiae* гибридизовался с хромосомной полосой

размером около 290 т.п.н., соответствующей хромосоме VI штамма *S. cerevisiae* YNN 295 (рис. 6б, дорожка 1). У штамма *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 378 выявлено два гибридационных сигнала: var. *bayanus*-типа и var. *ivarum*-типа (рис. 6б, дорожка 5). У штамма NBRC 1948 и штаммов *S. bayanus* var. *ivarum* обнаружен один гибридационный сигнал в районе хромосомы ~580 т.п.н. (дорожки 6, 10 и 11).

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 разновидности *S. bayanus* var. *bayanus* встречаются штаммы обоих типов.

Определение родства генетических популяций *S. bayanus* с помощью гибридологического анализа. Прежде всего были получены моноспоровые гомозиготные культуры исследуемых штаммов *S. bayanus* с высокой выживаемостью аскоспор: 79.2–100%. Полученные 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, Banno, 1989).

Выживаемость гибридных аскоспор была неодинаковой в различных популяциях. Гибрид новозеландских штаммов PYCC 6867 × PYCC 6869 был достаточно фертилен (с выживаемостью аскоспор 68.1%), тогда как при скрещивании штаммов *S. bayanus* var. *bayanus* NBRC 1948 × CBS 424 выявлена пониженная выживаемость аскоспор: всего 23.4%. По выживаемости гибридных аскоспор штаммы западнокитайской популяции разделились на такие же две группы, что и по *AluI*-профилям: WCh1 (4962, 4965) и WCh2 (4969, 4971, 4960). Внутри каждой группы выживаемость аскоспор составила, соответственно, 56.0 и 56.6%, а между штаммами из различных групп 32.1–36.8%. Все гибриды имели регулярное мейотическое расщепление контрольных ауксотрофных маркеров.

Межпопуляционный гибрид *S. bayanus* var. *bayanus* NBRC 1948 × *S. bayanus* var. *ivarum* CBS 7001 имел достаточно высокую выживаемость аскоспор: 54.5% (табл. 1). Однако, гибрид NBRC 1948 с *S. eubayanus* CBS 12357 был низкофертильным: 17.1%. Практически стерильным был гибрид *S. bayanus* var. *ivarum* PYCC 7083 × *S. eubayanus* CBS 12357: выживаемость аскоспор 2.5%. В скрещиваниях новозеландских штаммов с другими представителями комплекса *S. bayanus* также наблюдали пониженную 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 с участием западнокитайских штаммов были стерильны или полустерильны: 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. У всех гибридов наблюдали рекомбинацию родительских маркеров (табл. 1).

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 четыре группы (рис. 7).

Табл. 1. Гибридологический анализ межпопуляционных гибридов дрожжей комплекса *S. bayanus*: *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *ivarum*, *S. eubayanus*, новозеландская и западнокитайская 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
a) 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
a) 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

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 образовывали западнокитайские штаммы: 0–24.2% выживаемость аскоспор. Низкую выживаемость аскоспор имели гибриды *S. bayanus* var. *ivarum* с разновидностями *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. eubayanus*: 9–39% и 2.5–11% соответственно (рис. 7). Исключением был достаточно фертильный гибрид CBS 7001 × NBRC 1948, который имел 54.5% выживших аскоспор. Однако, гибриды штамма NBRC 1948 со штаммами

новозеландской популяции, *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. eubayanus* характеризовались низкой выживаемостью аскоспор: 17.1–23.4% (рис. 7).

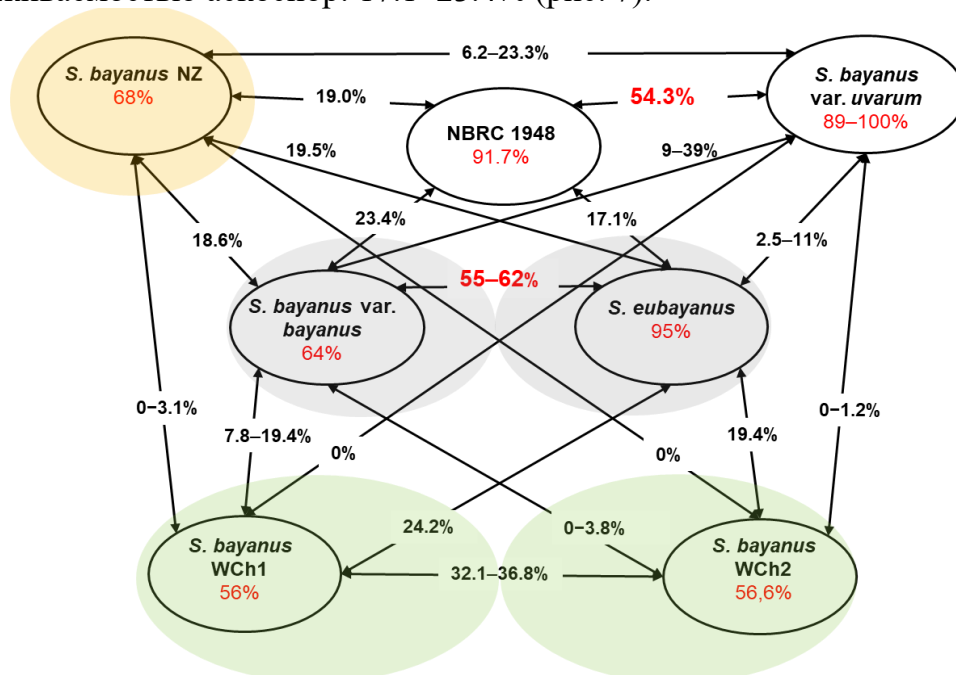


Рис. 7. Суммарные результаты гибридологического анализа генетических популяций комплекса *Saccharomyces bayanus*.

По-видимому, европейская популяция *S. bayanus* var. *bayanus* является связующим звеном между *S. eubayanus* и *S. bayanus* var. *uvarum*. Характерная для *S. bayanus* var. *uvarum* реципрокная транслокация (хромосомы VI/X) отсутствует у штаммов *S. eubayanus*, новозеландской и западнокитайской популяций, но имеется у некоторых штаммов *S. bayanus* var. *bayanus* – NBRC 1948 и CBS 378.

3. α -ГЛЮКОЗИДАЗЫ MAL И IMA ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES*

Для установления происхождения α -глюкозидаз IMA и MAL дрожжей *Saccharomyces* мы провели их поиск у филогенетически родственных родов *Lachancea* и *Kluveromyces* в базе данных GenBank. Дифференциацию α -глюкозидаз проводили с помощью субстрат-специфичных диагностических сайтов: для изомальтаз – Val216-Gly-Ser, а для мальтаз – Thr-Ala-Gly (Yamamoto et al., 2004). В качестве запроса использовали полную аминокислотную последовательность мальтазы MAL12 (YGR292W) генетической линии *S. cerevisiae* S288C.

На филогенетическом дереве (рис. 8), построенном по аминокислотным последовательностям α -глюкозидаз, выделяется хорошо обособленный кластер, включающий два субкластера с высокой статистической поддержкой (100%). Первый объединяет мальтазы MAL дрожжей *Saccharomyces* и 8 видов рода *Lachancea* (*L. quebecensis*, *L. thermotolerans*, *L. meyersii*, *L. fermentati*, *L. dasiensis*, *L. mirantina*, *L. lanzarotensis*, *L. fantastica*), уровень сходства которых составляет 75–99%. Во втором субкластере объединились 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 которых составляет 75–100%. Сходство между изомальтазами и мальтазами у видов *Saccharomyces* и *Lachancea* оказалось ниже: 68–72%. Мальтазы видов *L. kluyveri*, *L. quebecensis*, *L. thermotolerans*, *L. nothofagi*, *L. meyersii*, *L. lanzarotensis* объединились во втором кластере (64.5–93.7%

сходства). Отдельное положение занимают мальтазы *K. lactis* и *K. dobzhanskii*: 86.8–100%.



Рис. 8. Филогенетическое древо сходства аминокислотных последовательностей α -глюкозидаз дрожжей *Saccharomyces* (*S.*) и родственных им видов родов *Lachancea* (*L.*) и *Kluyveromyces* (*K.*). Приводятся значения бутстрепа не менее 70%. Шкала соответствует 100 заменам на 1000 аминокислотных остатков. В скобках указан регистрационный номер α -глюкозидаз в GenBank. Коричневым цветом выделены изомальтазы IMA5 дрожжей *Saccharomyces* и дивергентные изомальтазы видов *Lachancea*: *L. dassiensis*, *L. nothofagi*, *L. mirantina*, *L. kluyveri*. В качестве внешней группы использованы мальтазы дрожжей *Debaryomyces hansenii*, *Schizosaccharomyces pombe* и *Scheffersomyces stipitis*.

В третьем кластере (бутстреп 74%) объединились изомальтазы видов *L. dassiensis*, *L. nothofagi*, *L. mirantina*, *L. kluveri* и дивергентные изомальтазы IMA5 дрожжей *Saccharomyces*, которые со 100%-ной достоверностью объединены в отдельный подкластер. Дивергентная изомальтаза IMA5 не обнаружена только у вида *S. bayanus*. Для всех IMA5 дрожжей рода *Saccharomyces* было характерно наличие диагностического сайта Val211-Gly-Ser. Уровень сходства белков IMA5 дрожжей видов *S. cerevisiae*, *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* составляет 86.8–99.2%. Наиболее дивергентными оказались IMA5 видов *S. kudriavzevii* и *S. arboricola*: сходство 87.6%.

Таким образом, некоторые изоформы MAL и IMA дрожжей *Kluuveromyces* и *Lachancea* находятся в близком филогенетическом родстве с соответствующими α-глюкозидазами дрожжей рода *Saccharomyces*: 75–80.6% и 75–86.2% сходства. 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.

4. ПРИРОДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ПЕКТИНАЗНЫХ ГЕНОВ *PGU* ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES*

Скрининг на наличие пектинолитической активности был проведён у 541 штамма *Saccharomyces*. По диаметру зоны гидролиза пектина выделено 6 групп: 1) 0–5мм, 2) 5–10мм, 3) 10–15мм, 4) 15–20мм, 5) 20–25мм, 6) >25мм.

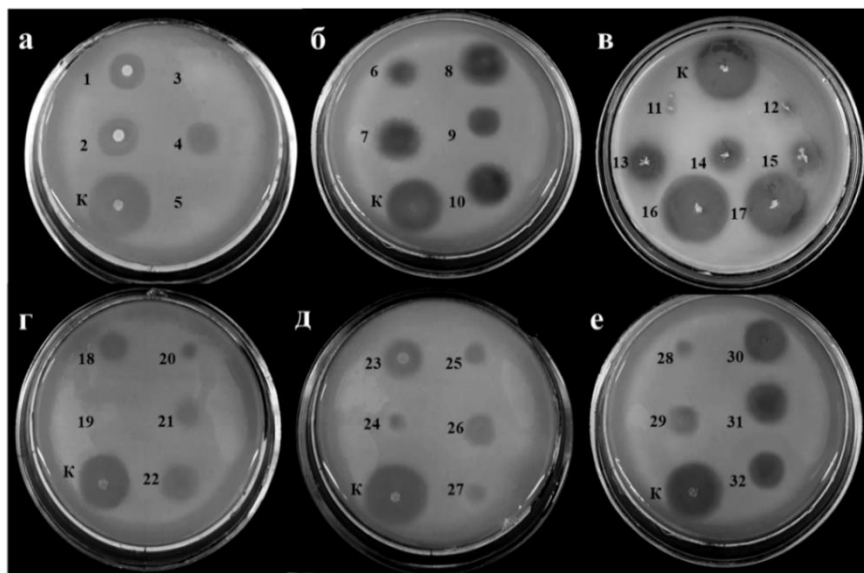


Рис. 9. Скрининг штаммов *Saccharomyces* на наличие пектинолитической активности на PG-среде: (а): *S. cerevisiae*: 1 – IGC 4591-4B, 2 – IGC 4591-4D, 3 – IGC 4541-3A, 4 – ВКМ Y-1553-3A, 5 – IGC 4546-2A; (б): *S. bayanus*: 6 – PYCC 7089, 7 – 4948, 8 – 4947, 9 – 4962, 10 – 4965; (в): *S. paradoxus*: 11 – ATCC 96968, 12 – UCDFST 71-101, 13 – UCDFST 73-538.2, 14 – UCDFST 72-145, 15 – UCDFST 67-570, 16 – UCDFST 62-186, 17 – UCDFST 61-220; (г): *S. kudriavzevii*: 18 – ES14S09, 19 – NBRC10991, 20 – NBRC 1802, 21 – NBRC 10990; *S. cariocanus*: 22 – UFRJ 50816, (д): 23 – UFRJ 50791; *S. mikatae*: 24 – NBRC 1815, 25 – NBRC 11002, 26 – NBRC 11003, 27 – NBRC 10996; (е): *S. arboricola*: 28 – AS 2.3319, 29 – AS 2.3318; *S. jurei*: 30 – ВКМ Y-3330, 31 – CBS 14759, 32 – NCYC 3962. К – Контрольный штамм *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718, обладающий высокой пектинолитической активностью (патент SU 1495368).

– NBRC10991, 20 – NBRC 1802, 21 – NBRC 10990; *S. cariocanus*: 22 – UFRJ 50816, (д): 23 – UFRJ 50791; *S. mikatae*: 24 – NBRC 1815, 25 – NBRC 11002, 26 – NBRC 11003, 27 – NBRC 10996; (е): *S. arboricola*: 28 – AS 2.3319, 29 – AS 2.3318; *S. jurei*: 30 – ВКМ Y-3330, 31 – CBS 14759, 32 – NCYC 3962. К – Контрольный штамм *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718, обладающий высокой пектинолитической активностью (патент SU 1495368).

Большинство штаммов *S. cerevisiae* (249), выделенных из отходов оливкового производства и природных источников, не имели активности на PG-среде. Имеющие активность дрожжи представлены, в основном, винными штаммами (рис. 9а). Наибольшая активность обнаружена у трех винных штаммов (25.3–26.8 мм) и

штаммов, выделенных из сока пальмы в Малайзии и Джибути (23–23.8 мм). Из 99 штаммов комплекса *S. bayanus*, только штамм *S. bayanus* var. *ivarum* PJS 1.94 не имел активности. Остальные штаммы обладали пектинолитической активностью и были отнесены к 3 и 4 группам (рис. 9б). Наивысшую активность имели штаммы *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 378 (23.7мм); *S. bayanus* var. *ivarum* CBS 431 (23.7мм), M472-2A (20.7мм), CBS 8711 (20.1мм), NCAIM Y.000676-3-4 (23.8мм); *S. eubayanus* 4940 (20.3мм), 4946 (21.5мм), 4947 (22.2мм), 4948 (20.5мм); *S. bayanus* WCh 4960 (22.3мм).

Пектинолитическая активность была определена у 100 штаммов *S. paradoxus*, относящихся к четырем географическим популяциям: европейской, дальневосточной, североамериканской и гавайской. Пектинолитическая активность отсутствовала у двух европейских и 5 гавайских штаммов (рис. 9в). Все остальные штаммы были способны секретировать активную эндо-полигалактуроназу, при этом не было обнаружено ни одного штамма с диаметром зоны лизиса <11 мм. Достаточно высокой активностью обладали североамериканские штаммы *S. paradoxus* UCDFST 62-186 (27.4мм) и UCDFST 61-220 (25.4мм) (рис. 9в, номера 16 и 17). Штаммы *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae* имели невысокую активность ($d \leq 15$ мм) (рис. 9г, д, е). Штаммы *S. jurei* отнесены к 3 и 4 группам: NCYC3962 (14.7мм), CBS 14759 (17.2мм), ВКМ Y-3330 (17.3мм) (рис. 9е).

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

Саузерн-гибридизация хромосомных ДНК дрожжей видов *S. cerevisiae*, *S. cariocanus*, *S. paradoxus* и *S. kudriavzevii* с зондом *PGU1* *S. cerevisiae* показала, что гены *PGU1p* *S. paradoxus*, *PGU1k* *S. kudriavzevii*, *PGU1c* *S. cariocanus* и *PGU1* *S. cerevisiae* имеют одинаковую локализацию – в районе хромосомы X стандартного штамма YNN 295 (рис. 10а, дорожки 1, 2, 3–11, 12, 13 и 14–20). Молекулярные кариотипы видов *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. kudriavzevii* коллинеарны (Fisher et al., 2000).

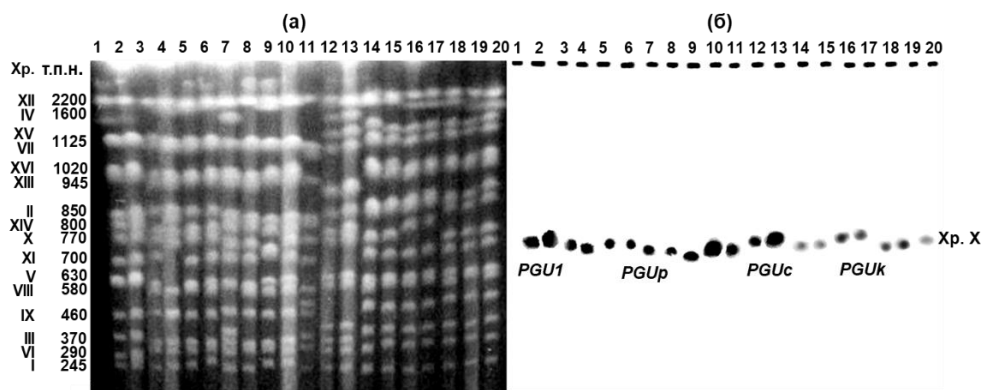


Рис. 10. Пульс-электрофорез (а) и Саузерн-гибридизация (б) хромосомной ДНК дрожжей *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus* и *S. kudriavzevii* с зондом *PGU1* *S. cerevisiae* S288C. *S. cerevisiae*: 1 – YNN 295, 2 – S288C; *S. paradoxus*: 3 – CBS 432, 4 – CBS 5829, 5 – CBS 406, 6 – N17, 7 – 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.

Дрожжи *S. cariocanus* имеют в кариотипе четыре реципрокные транслокации (между хромосомами IX/XV, II/XVI, XI/IV и XII/XIV), которые не затрагивают хромосому X (рис. 10, дорожки 12 и 13). Согласно результатам Саузерн-гибридизации, у дрожжей *S. arboricola* ген *PGU1a* также расположен в хромосоме X

(рис. 11б, дорожки 19–22). У вида *S. arboricola* имеется одна реципрокная транслокация между хромосомами IV и XIII (Liti et al., 2013).

Два гибридационных сигнала (хромосомы X и VIII) обнаружено у видов *S. mikatae* и *S. jurei* (рис. 11, дорожки 3–16, 17, 18 и 1). Реципрокные транслокации в кариотипах этих видов не затрагивают хромосомы X и VIII (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.

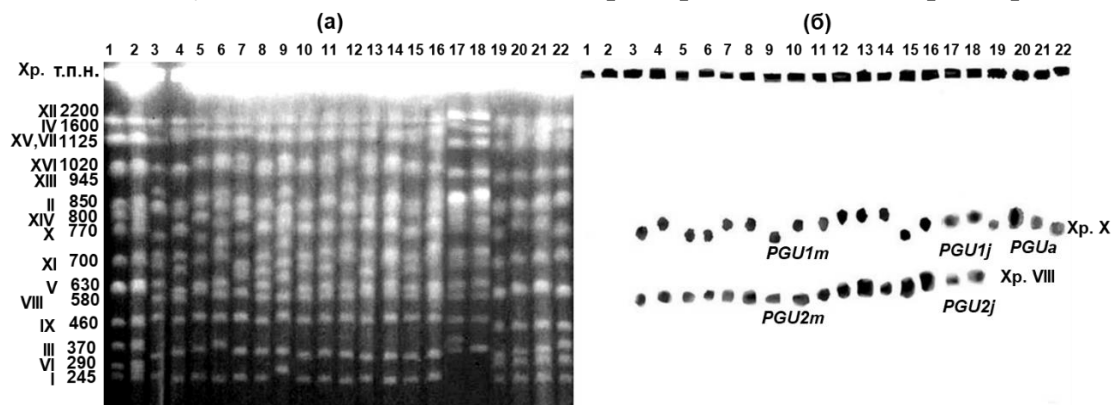


Рис. 11. Пульс-электрофорез (а) и Саузерн-гибридизация (б) хромосомной ДНК дрожжей *S. mikatae*, *S. jurei* с зондом *PGU1m* NBRC 1815 и *S. arboricola* с зондом *PGU1a* CBS 10644. *S. cerevisiae*: 1 – YNN 295, 2 – S288C; *S. mikatae*: 3 – NBRC 1815, 4 – NBRC 1816, 5 – NBRC 10992, 6 – NBRC 10993, 7 – 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.

Три гибридационных сигнала обнаружено у штаммов *S. bayanus* (рис. 12б, дорожки 2–14). Сильный гибридационный сигнал отмечен на хромосоме X. Два сигнала расположены на хромосомных полосках, которые по размеру соответствуют хромосомам I и XIV стандартного штамма YNN 295 (рис. 12б, дорожка 1). Только винный штамм *S. bayanus* var. *ivarum* PJS1.94 имеет генотип с двумя генными копиями *PGU1b* и *PGU3b*. По-видимому, наличие всех трех генов *PGU* определяет способность дрожжей *S. bayanus* var. *ivarum* расщеплять пектиновые соединения.

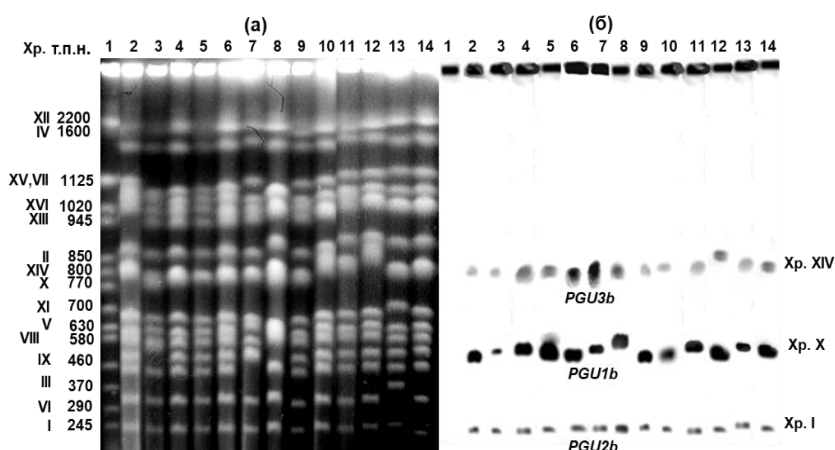


Рис. 12. Пульс-электрофорез (а) и Саузерн-гибридизация (б) хромосомных ДНК дрожжей *S. bayanus* с зондом *PGU1b* CBS 7001. *S. cerevisiae*: 1 – YNN 295; *S. bayanus*: 2 – CBS 395, 3 – M300, 4 – T5/6, 5 – CBS 7001, 6 – ВКМ Y-1146, 7 – D13, 8 – ВКМ Y-361, 9 – ВКПМ Y-2528, 10 – CBS 8711, 11 – PYCC 6867, 12 – TBVIc2.95, 13 – NCAIM Y.00676, 14 – NCAIM Y.00677.

Таким образом, дрожжи *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* и *S. paradoxus* обладают только одним геном *PGU* (хр. X). У остальных видов обнаружены полимерные гены *PGU* разной хромосомной локализации: *S. mikatae* и *S. jurei* (хромосомы X и VIII), *S. bayanus* (хромосомы X, I и XIV).

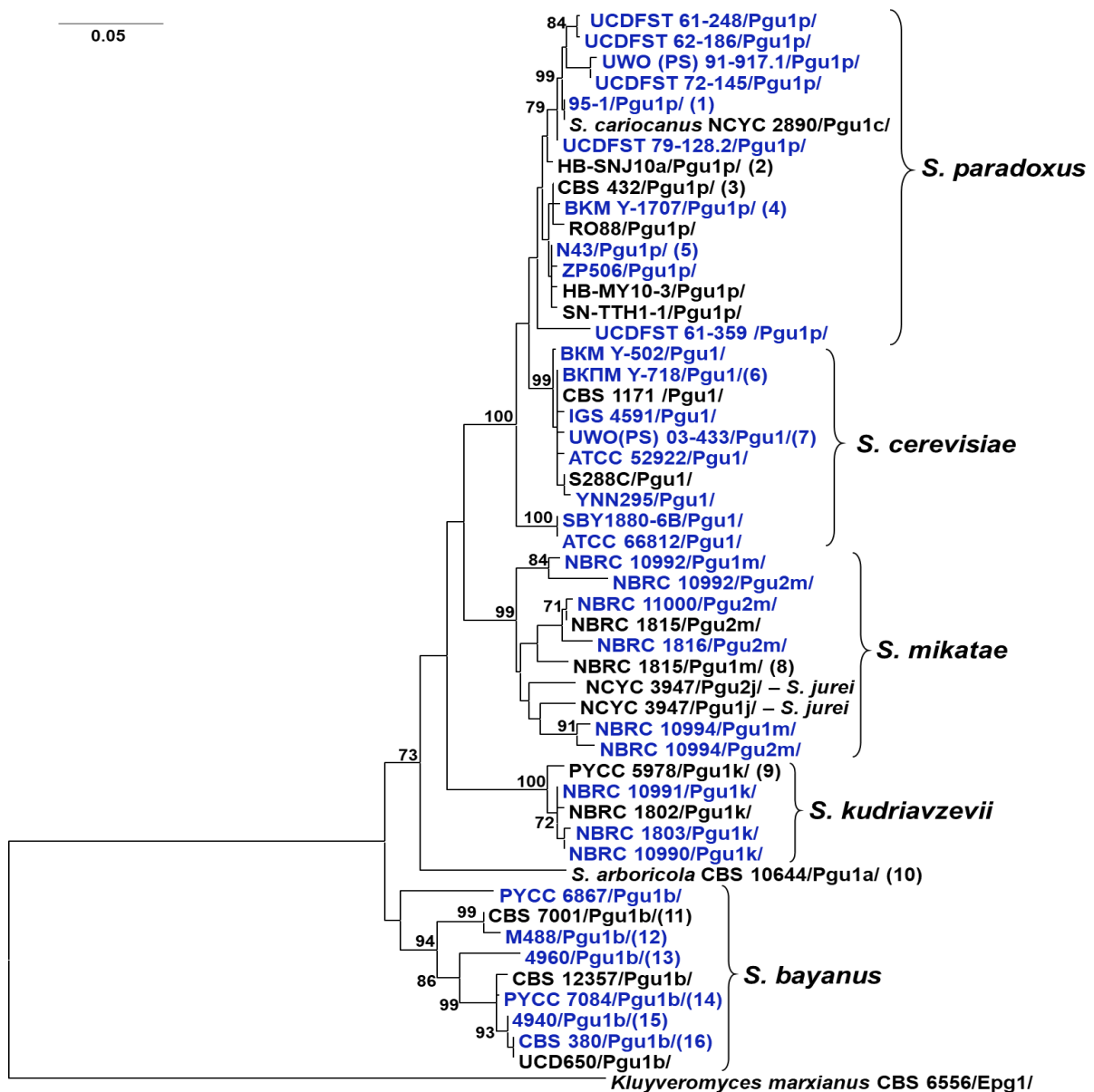


Рис. 13. Филогенетический анализ сходства аминокислотных последовательностей эндополигалактуроназ Pgu дрожжей рода *Saccharomyces*. В качестве внешней группы использована последовательность эндо-полигалактуроназы дрожжей *Kluveromyces marxianus*. Приводятся значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует 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, CECT 10560, SRC258, PYCC7083; (13) – 4962, 4965; (14) – yHKS210, PYCC 7085, PYCC 7086, PYCC 7087, PYCC 7088; (15) – 4946, 4947, 4948; (16) – CBS 378, NBRC 1948. Синим цветом выделены штаммы, нуклеотидные последовательности которых определены в данной работе.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей эндо-полигалактуроназ дрожжей *Saccharomyces* был проведен у штаммов разной видовой принадлежности, отличающихся по пектинолитической активности. По полученным нами и имеющимся в GenBank нуклеотидным последовательностям были определены последовательности белков, на основании анализа которых было построено филогенетическое древо (рис. 13).

Изученные эндо-полигалактуроназы дрожжей *Saccharomyces* разделились на два основных кластера. Первый подкластер (бутстреп 100%) образовали эндо-полигалактуроназы видов *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. cariocanus*, идентичные на 94.9–97.9% (рис. 13). Сравнительный анализ показал, что североамериканская и дальневосточная популяции *S. paradoxus* отличаются более высоким генетическим разнообразием, чем европейская и гавайская. Второй подкластер, с высокой статистической поддержкой (99%), объединяет белки видов *S. mikatae* (Pgu1m, Pgu2m) и *S. jurei* (Pgu1j, Pgu2j), которые сходны на 95.0–96.4%. Третий подкластер сформировали белки Pgu1k дрожжей *S. kudriavzevii*, идентичные на 98.3–100%. По последовательностям Pgu они разделились на две группы: европейские и дальневосточные штаммы. Сходство эндо-полигалактуроназ трех подкластеров составило 87.7–92.2%. К первому кластеру примыкает белок Pgu1a вида *S. arboricola*: 85.5–87.7% сходства с остальными белками Pgu первого кластера.

Второй кластер включает белки Pgu1b дрожжей вида *S. bayanus*, которые идентичны на 90.2–100% (рис. 13). Их сходство с белками Pgu остальных видов *Saccharomyces* составило 84.5–89.5%. Следует отметить, что гены *PGU1b* гибридных дрожжей *S. pastorianus* CBS 1538 и *S. bayanus* var. *bayanus* идентичны.

Нуклеотидные последовательности генов *PGU1b* типовой культуры CBS 1538 и 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. В геноме всех указанных штаммов *S. pastorianus* не обнаружено пектиназных генов *S. cerevisiae*-типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью молекулярных методов и гибридологического анализа изучено природное разнообразие дрожжей рода *Saccharomyces* на материале штаммов различного экологического и географического происхождения. Впервые в России обнаружены дрожжи редкого вида *S. jurei* и разработан экспресс-метод их молекулярной дифференциации. Показано, что вид *S. jurei* филогенетически наиболее близок к виду *S. mikatae*, тогда как *S. bayanus* и *S. arboricola* являются наиболее дивергентными видами рода *Saccharomyces*. Впервые проведен кариотипический анализ всех видов рода *Saccharomyces*. В молекулярном кариотипе вида *S. jurei* выявлено две реципрокные транслокации: одна уникальная (между хромосомами I и XIII), а вторая общая с видом *S. mikatae* (хромосомы VI и VII). Только хромосома III имеет одинаковые размеры у всех восьми видов рода *Saccharomyces*.

Установлена сложная структура комплексного вида *S. bayanus*, который включает пять генетических популяций: *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *ivarum*, *S. eubayanus*, западнокитайскую и новозеландскую популяции. Полученные

результаты свидетельствуют о значительной генетической дивергенции западнокитайских и новозеландских штаммов, которые образуют полустерильные гибриды в скрещиваниях как между собой, так и со штаммами остальных популяций, а также отличаются по нуклеотидным последовательностям всех изученных генов. Между *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *ivarum*, *S. eubayanus*, новозеландской и западнокитайской популяциями нет полной межвидовой постзиготической изоляции, и они относятся к одному биологическому виду *S. bayanus*, обладая дивергенцией геномов на уровне таксономических разновидностей.

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 *Kluveromyces* дубликация не проходила (Kellis et al., 2004; Scannell et al., 2007; Souciet et al., 2009; Dujon, Louis, 2017). Согласно проведенному нами филогенетическому анализу, гены изомальтазы (IMA1–IMA4) и мальтазы (MAL) возникли у общего протоплоидного предка дрожжей родов *Saccharomyces*, *Lachancea* и *Kluveromyces*, т.е. до их расхождения и до полной дубликации генома *Saccharomyces*. Дивергентная изомальтаза IMA5 появилась в геноме дрожжей *Saccharomyces* уже после их расхождения с протоплоидными дрожжами *Lachancea* и *Kluveromyces*.

Впервые изучено распространение и особенности пектиназных генов у видов рода *Saccharomyces*. Обнаружена видоспецифичность генов *PGU*, а также их внутривидовой полиморфизм у дрожжей вида *S. kudriavzevii*, связанный с географическим происхождением штаммов. Согласно Саузерн-гибридизации, виды *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* и *S. paradoxus* обладают одним геном *PGU*, тогда как у остальных трех видов обнаружено несколько полимерных генов *PGU*: два у видов *S. mikatae* и *S. jurei*, и три у вида *S. bayanus*. Однокопийный ген *PGU1* референсного штамма *S. cerevisiae* S288C расположен в хромосоме X. 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, а 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*. Экологической нишей дрожжей вида *S. bayanus* является виноградарство и виноделие, тогда как дрожжи *S. paradoxus* встречаются преимущественно в природных условиях (Наумов и др., 2011; Наумов, 2013). По-видимому, полигалактуронозная составляющая растительного пектина является важной частью углеводного питания обитающих в природе дрожжей *S. paradoxus*.

Масштабный скрининг пектинолитической активности у дрожжей *Saccharomyces* различного происхождения позволил обнаружить штаммы *S. cerevisiae*, *S. bayanus* и *S. paradoxus*, способные секретировать активную эндополигалактуронозу, и поэтому представляющие интерес для дальнейших генетических исследований и селекционных работ с винными дрожжами.

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* (между хромосомами VI и 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 α -глюкозидаз показал, что изомальтазы (IMA1–IMA4) и мальтазы MAL возникли 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 дубликации генома *Saccharomyces*.

5. Установлен значительный внутри- и межвидовой полиморфизм секреции эндо-полигалактуроназы у дрожжей рода *Saccharomyces*. Из восьми видов *Saccharomyces* высокая пектинолитическая активность характерна только для видов *S. bayanus* и *S. paradoxus*, что, по-видимому, является видоспецифической особенностью этих дрожжей.

6. Впервые изучена встречаемость и особенности пектиназных генов *PGU* у видов рода *Saccharomyces*. Установлено, что дрожжи *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* и *S. paradoxus* обладают одним геном *PGU*, расположенным на хромосоме X. У остальных видов обнаружены полимерные гены *PGU* разной хромосомной локализации: 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Научные статьи, опубликованные в журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science:

1. Наумов Г.И., **Боровкова А.Н.**, Шнырёва А.В., Наумова Е.С. Филогенетическое происхождение α -глюкозидаз MAL и IMA международной генетической линии *Saccharomyces cerevisiae* S288C // Микробиология. 2019. Т.88. №1. С.45–52. (ИФ (РИНЦ) 1.052) Naumov G.I., **Borovkova A.N.**, Shnyreva A.V., Naumova E.S. Phylogenetic origin of the MAL and IMA alpha-glucosidases of the international genetic line of *Saccharomyces cerevisiae* S288C // Microbiology. 2019.V. 88. № 1. P. 39–45. (WoS JIF 1.5) Вклад автора в печатных листах: (0,5 п.л. / 0,18 п.л.)
2. **Боровкова А.Н.**, Михайлова Ю.В., Наумова Е.С. Молекулярно-генетические особенности биологических видов дрожжей *Saccharomyces* // Микробиология. 2020. Т. 89. №4. С. 390–399. (ИФ (РИНЦ) 1.052) **Borovkova A.N.**, Michailova Yu.V., Naumova E.S. Molecular genetic characteristics of the *Saccharomyces* biological species // Microbiology. 2020. V. 89. № 4. P. 387–395. (WoS JIF 1.5) (0,62 п.л. / 0,46 п.л.)
3. Наумова Е.С., **Боровкова А.Н.**, Шаламитский М.Ю., Наумов Г.И. Природный полиморфизм пектиназных генов *PGU* дрожжей рода *Saccharomyces* // Микробиология. 2021. Т. 90. №3. С. 344–356. (ИФ (РИНЦ) 1.052) Naumova E.S., **Borovkova A.N.**, Shalamitskiy M.Yu., Naumov G.I. Natural polymorphism of pectinase *PGU* genes in the *Saccharomyces* yeasts // Microbiology. 2021. V. 90. № 3. P. 349–360. (WoS JIF 1.5) (0,81 п.л. / 0,56 п.л.)
4. **Боровкова А.Н.**, Шаламитский М.Ю., Наумова Е.С. Отбор штаммов *Saccharomyces bayanus* с высокой пектинолитической активностью и филогенетический анализ генов *PGU* // Биотехнология. 2022. Т. 38. № 1. С. 13–24. (ИФ (РИНЦ) 0.390) **Borovkova A.N.**, Shalamitskiy M.Yu., Naumova E.S. Selection of *Saccharomyces bayanus* strains with high pectinolytic activity and phylogenetic analysis of *PGU* genes // Applied Biochemistry and Microbiology. 2022. V. 58. № 9. P. 966–975. (WoS JIF 0.8) (0,75 п.л. / 0,62 п.л.)
5. **Боровкова А.Н.**, Наумов Г.И., Шнырёва А.В., Наумова Е.С. Генетически изолированная популяция дрожжей *Saccharomyces bayanus* в Новой Зеландии и Австралии // Генетика. 2023. Т. 59. № 4. С. 403–416. (ИФ (РИНЦ) 0.798) **Borovkova A.N.**, Naumov G.I., Shnyreva A.V., Naumova E.S. A genetically isolated population of *Saccharomyces bayanus* in New Zealand and Australia // Russian Journal of Genetics. 2023. V. 59. № 4. P. 344–355. (WoS JIF 0.6) (0,87 п.л. / 0,53 п.л.)
6. **Боровкова А.Н.**, Шаламитский М.Ю., Наумова Е.С. Пектинолитические дрожжи *Saccharomyces paradoxus* – новый генофонд для виноделия // Микробиология. 2023. Т. 92. № 2. С. 219–232. (ИФ (РИНЦ) 1.052) **Borovkova A.N.**, Shalamitskiy M.Yu., Naumova E.S. Pectinolytic yeast *Saccharomyces paradoxus* as a new gene pool for winemaking // Microbiology. 2023. V. 92. № 2. P. 256–268. (WoS JIF 1.5) (0,87 п.л. / 0,63 п.л.)