



© Ю. В. Михайлова<sup>1</sup>,  
С. Кастелло<sup>2</sup>, Е. С. Наумова<sup>1</sup>,  
Г. И. Наумов<sup>1</sup>

## АЛЛО- И СИМПАТРИЧЕСКИЕ ВИДЫ-ДВОЙНИКИ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*: ДНК–ДНК ГОМОЛОГИЯ

<sup>1</sup> Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

<sup>2</sup> Новый университет Лиссабона, Капарика, Португалия

✿ Впервые получены однозначные данные о ДНК–ДНК реассоциации новых биологических видов *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae*. Три указанных вида имели 25–51%-ю ДНК–ДНК реассоциацию между собой и с ранее известными видами *S. cerevisiae*, *S. bayanus* и *S. paradoxus*. Исключением является комбинация *S. paradoxus* × *S. cariocanus* — 99%-я ДНК–ДНК гомология. Несмотря на высокую гомологию последние два вида имеют генетическую постзиготическую изоляцию; их гибриды стерильны, образуя мертвые продукты мейоза (аскоспоры). Имея четыре реципрокные хромосомные транслокации, *S. cariocanus* представляет собой зарождающийся вид (*species in statu nascendi*).

✿ **Ключевые слова:** популяции; виды-двойники; дрожжи *Saccharomyces*; гомология геномов; ДНК–ДНК реассоциация.

### ВВЕДЕНИЕ

До последнего времени гомология геномов, определяемая ДНК–ДНК реассоциацией, была главенствующим признаком при описании новых видов микроорганизмов, в частности, дрожжей. Разработка концепции биологического вида на дрожжах *Saccharomyces* (Наумов и др., 1983; Наумов, 1987; Наумов et al., 2000) подтвердила объективность такого подхода. Генетический анализ позволил выявить, кроме *S. cerevisiae*, еще два биологических вида рода *Saccharomyces* из списка синонимов: *S. bayanus* и *S. paradoxus*. Эти же три космополитных симпатрических вида дифференцированы ДНК–ДНК реассоциацией; кроме того, обнаружены естественные гибриды *S. cerevisiae* × *S. bayanus* (Vaughan Martini, Kurtzman, 1985; Vaughan Martini, 1989). Прорывом в эволюционной и таксономической генетике дрожжей *Saccharomyces* является открытие генетическим анализом сразу трех новых биологических видов: эндемичных дрожжей *S. cariocanus* (Бразилия), *S. mikatae* (Япония) и *S. kudriavzevii* (Япония, Португалия) (Наумов et al., 2000). Установленные нами шесть биологических видов *Saccharomyces* стали объектом интенсивных молекулярно-генетических исследований многих лабораторий в Западной Европе и США (PubMed — <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Тем не менее, в литературе нет исчерпывающих данных о ДНК–ДНК гомологии по всем видам рода *Saccharomyces*.

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

В настоящей статье впервые получены однозначные данные о ДНК–ДНК гомологии трех новых видов рода *Saccharomyces*: *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae*.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованные штаммы дрожжей приведены в таблице 1. Дрожжи культивировали при 27 °С на полной питательной среде YPD. Клетки разрушали механически, путем пропускания замороженной суспензии через пресс. Выделение, очистку ДНК и ДНК–ДНК реассоциацию проводили согласно протоколу лаборатории (Rodrigues de Sousa et al., 1995). ДНК очищали методом хроматографии в гидроксиллапатитных колонках со-

Поступила в редакцию 20.08.2009  
Принята к публикации 05.11.2009

Таблица 1

Происхождение изученных дрожжей *Saccharomyces*

Видовая принадлежность и коллекционный № штамма*	Источник и место выделения штамма
<i>S. bayanus</i> PYCC 4556 (T)	Испорченное пиво
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 4555 (T)	Верховые пивные дрожжи, Голландия
<i>S. cariocanus</i> UFRJ 50791 UFRJ 50816 (T)	<i>Drosophila</i> sp., Рио-де-Жанейро, Бразилия <i>Drosophila</i> sp., Рио-де-Жанейро, Бразилия
<i>S. kudriavzevii</i> NBRC 1802 (T) NBRC 1803	Опад листьев, Япония Опад листьев, Япония
<i>S. mikatae</i> NBRC 1815 (T) NBRC 1816	Почва, Япония Опад листьев, Япония
<i>S. paradoxus</i> PYCC 4570 (T)	Сокотечение дерева, Россия
*Сокращение названий коллекций: PYCC — Portuguese Yeast Culture Collection, Universidade Nova de Lisboa, Caparica, Portugal; UFRJ — Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil; NBRC — National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japan. Штаммы видов <i>S. cariocanus</i> , <i>S. kudriavzevii</i> , <i>S. mikatae</i> и <i>S. paradoxus</i> представлены нашими моноспоровыми культурами.	

гласно Britten et al. (1970). Для опытов по реассоциации ДНК была концентрирована осаждением с этанолом (Маниатис и др., 1984). Степень гомологии ДНК оценивали спектрофотометрическим методом путем определения кинетики ДНК–ДНК реассоциации, как описано Seidler и Mandel (1971) в модификации Kurtzman et al. (1980). Использовали спектрофотометр Gilford Response II и его программу термальной кинетики. Концентрацию ДНК доводили до 75 мг/мл ( $A_{260} = 1,5$ ) буфером, содержащем  $5 \times \text{SSC}$  и 20 % DMSO. Оптимальную температуру ренатурации определяли вычитанием 25 °C от значения  $T_m$ . Образцы ДНК денатурировали при 95 °C в автоматизированном термостатическом спектрофотометре 10 минут, чтобы удостовериться в завершении гиперхромического эффекта при  $A_{260}$ , далее следовало быстрое охлаждение (3 °C/мин) до 25 °C ниже  $T_m$ . Первые показания оптической плотности после падения температуры — 0 % ренатурации, тогда как 100 % ренатурации соответствует оптической плотности нативной ДНК при  $T_m$  — 25 °C перед гиперхромическим эффектом. Реакции реассоциации длились до  $C_0t_{1/2}$ , что соответствует времени, за которое ренатурация исследуемых образцов ДНК достигнет 50 % ( $t_{1/2}$ ). Процент геномной комплементации определяется следующей формулой (Seidler, Mandel, 1971):

$$\{1 - [\text{obs. } C_0t_{1/2}^{\text{mix}} + (C_0t_{1/2}^{100} - C_0t_{1/2}^0)] / C_0t_{1/2}^{100}\} \times 100,$$

где obs.  $C_0t_{1/2}^{\text{mix}}$  — наблюдаемая,  $C_0t_{1/2}^{100}$  — ренатурированной смеси,  $C_0t_{1/2}^0$  — ожидаемая  $C_0t_{1/2}$  в случае, если 2 молекулы ДНК идентичны по последовательности

(полное отсутствие аддитивности), и  $C_0t_{1/2}^0$  соответствует  $C_0t_{1/2}$  смеси при неидентичных последовательностях ДНК (полная аддитивность независимо измеренных значений  $C_0t_{1/2}$ ).

Определение ДНК гомологии методом оптической ренатурации показывает степень ренатурации гетерологичной ДНК, сравниваемой с двумя гомологичными системами ДНК.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Метод ДНК–ДНК реассоциации позволяет улавливать достаточно протяженные районы генетической гомологии между молекулами ДНК различных организмов. На основании сравнения видов дрожжей различных родов в свое время 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. Определенную трудность вызывает промежуточный уровень ДНК–ДНК реассоциации — 60–70 %. В этом случае возможны разные точки зрения: разные виды, один вид или разновидности одного вида. С использованием данного подхода удалось установить гибридную природу дрожжей *S. pastorianus* (syn. *S. carlsbergensis*): *S. cerevisiae* × *S. bayanus* (Vaughan Martini, Kurtzman, 1985). Определены значения ДНК–ДНК реассоциации для всех комбинаций видов *S. cerevisiae*,

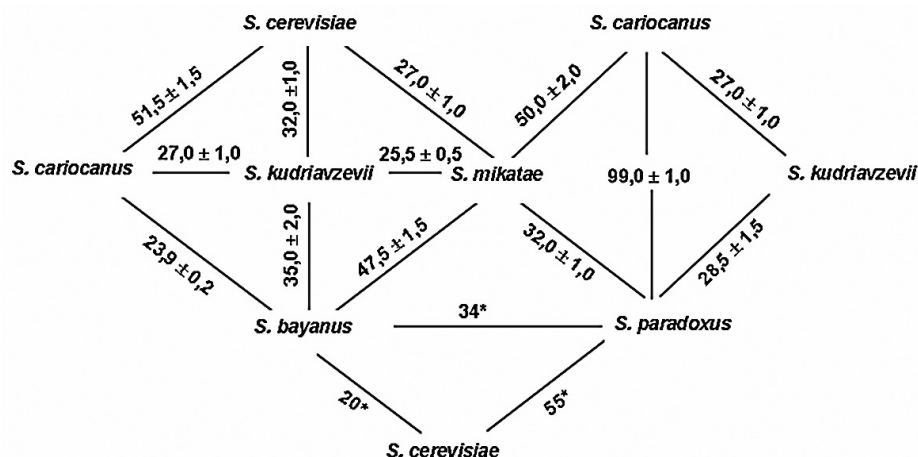


Рис. 1. Гомология ДНК (%) биологических видов дрожжей *Saccharomyces*. Использовались типовые культуры. Звездочкой обозначены данные по ДНК–ДНК реассоциации из работы (Vaughan Martini, 1989).

*S. bayanus*, и *S. paradoxus* (Vaughan Martini, Kurtzman, 1985; Vaughan Martini, 1989). ДНК–ДНК реассоциация *S. bayanus* с *S. cerevisiae* составляет 20 %, а с *S. paradoxus* — 0–34 %. Степень родства разных штаммов *S. cerevisiae* и *S. paradoxus* колеблется от 46 до 59 % (Vaughan Martini, 1989). В тоже время штаммы одного биологического вида характеризуются высокой ДНК–ДНК реассоциацией: *S. cerevisiae* (86–100 %), *S. paradoxus* (74–99 %) и *S. bayanus* (86–100 %).

С помощью ДНК–ДНК реассоциации мы изучили родство дрожжей *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae* как между собой, так и с типовыми культурами *S. cerevisiae*, *S. bayanus* и *S. paradoxus*. Для каждого из видов *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae* было исследовано по два штамма, включая типовые культуры. Все опыты проводились в трех повторностях. Полученные значения ДНК–ДНК реассоциации представлены в основном на рисунке 1.

Как и ожидалось, ДНК–ДНК реассоциация штаммов одного и того же вида была высокой: 88–100 %. Ее значения в межвидовых комбинациях были более низкими: от 24 до 51 %. Низкая гомология ДНК обнаружена между штаммами *S. kudriavzevii* и остальными 5 видами: от 25 до 35 %. Несколько большие значения ДНК–ДНК реассоциации с остальными видами имеет типовая культура *S. mikatae* NBRC 1802: 25–50 % (рис. 1). *S. paradoxus* и *S. cariocanus* являются наиболее генетически родственными видами *S. cerevisiae*: 50%-я ДНК–ДНК реассоциация. Особый интерес представляют результаты ДНК–ДНК реассоциации с участием дрожжей *S. cariocanus*. ДНК гомология дрожжей *S. cariocanus* и *S. paradoxus* составила 99 %, что соответствует уровню гомологии конспецифичных штам-

мов. Тогда как ДНК–ДНК реассоциация *S. cariocanus* с видами *S. bayanus*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae* была соответственно 24, 27 и 50 %.

Для сравнения необходимо отметить предварительные неполные литературные данные по гомологии геномов *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae*. Во-первых, в коротких тезисах бразильской конференции (Lemos et al., 1995), согласно 94%-й ДНК–ДНК реассоциации, сообщалось о конспецифичности видов *S. paradoxus* и *S. cariocanus*; тогда как последний таксон имел 60%-ю ДНК–ДНК гибридизацию с *S. bayanus*, *S. cerevisiae* и *S. pastorianus*. Гомология ДНК дрожжей *S. kudriavzevii* и *S. mikatae* была ранее определена только в некоторых комбинациях. У штаммов *S. kudriavzevii* с типовой культурой *S. bayanus* она составляет 26 %, а с типовой культурой *S. paradoxus* — 51 % (Kaneko, Banno, 1991). Штаммы *S. mikatae* имеют с *S. bayanus* 26%-ю ДНК-гомологию, а с *S. cerevisiae* — 46 % (Yamada et al., 1993). ДНК-гомология штаммов одного и того же вида была высокой, однако авторы не привели конкретные значения. Следует указать, что гомология ДНК японскими коллегами определялась с помощью гибридизации не очень чувствительным методом колориметрической окраски на плашках (microplate hybridization method) (Kaneko, Banno, 1991), который является менее точным по сравнению с использованным нами методом ДНК–ДНК реассоциации. Практически, это не количественный, а качественный метод. Тем не менее, полученные нами и вышеприведенные литературные данные достаточно хорошо согласуются.

Специального внимания заслуживает статус таксона *S. cariocanus*. Несмотря на то что эти дрожжи

имеют высокую гомологию ДНК с *S. paradoxus*, они представляют разные биологические виды: межвидовые гибриды *S. cariocanus* × *S. paradoxus* стерильны (Naumov et al., 2000). Причиной нежизнеспособных продуктов мейоза (аскопор) таких гибридов, вероятно является наличие четырех хромосомных транслокаций у *S. cariocanus* (Fischer et al., 2000). Очевидно, что этот таксон является зарождающимся видом (*species in statu nascendi*). Еще один таксон такой категории был обнаружен нами на примере гавайской популяции *S. paradoxus* (Наумов, 1999). Последние дрожжи образовывали стерильные гибриды с европейской популяцией, но частично стерильные гибриды с североамериканской и дальневосточной популяциями *S. paradoxus*. Имеющиеся данные позволяют ставить вопрос, по крайней мере, о недостаточности критерия 80–100%-й ДНК–ДНК реассоциации для диагностики биологического вида дрожжей. Напомним, что биологические виды — это, прежде всего, генетически изолированные популяции.

В Китае найден новый биологический вид *S. arboricolus* (Wang, Bai, 2008; Наумов, 2009а); еще предстоит с ним, а также с гавайской популяцией *S. paradoxus* опыты по ДНК–ДНК реассоциации. Также недавно в Португалии обнаружен биологический вид *S. kudriavzevii* (Sampaio, Gonçalves, 2008; Наумов, 2009б), до этого он был известен только по изолятам из Японии.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Статья посвящена светлой памяти профессора Isabel Spencer-Martins (1951–2008), внесшей большой вклад в таксономическое изучение дрожжей.

Работа была поддержана частично грантом РФФИ (09-04-0664) и грантом Федерации Европейского Общества Микробиологов (FEMS) для молодых ученых (Ю. В. Михайловой). Исследование проводилось в сотрудничестве с центром микробиологических ресурсов Нового университета Лиссабона, Капарика, Португалия (Centro de Recursos Microbiologicos, New University of Lisbon, Caparica).

## Литература

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж., 1984. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. Москва: Мир, 479 с.
2. Наумов Г. И., 1999. Дивергентная популяция дрожжей *Saccharomyces paradoxus* на Гавайях: вид *in statu nascendi* // Докл. АН. Т. 364. № 2. С. 281–283.
3. Наумов Г. И., 2009а. Гибридологический анализ нового биологического вида *Saccharomyces arboricolus* Wang et Bai // Докл. АН. Т. 426. № 3. С. 424–426.
4. Наумов Г. И., 2009б. Генетическая идентификация дрожжей *Saccharomyces kudriavzevii* из европейской популяции // Экологическая генетика. Т. 7. № 1. С. 9–11.
5. Наумов Г. И., Кондратьева В. И., Наумова Т. И., Гудкова Н. К., 1983. Генетические основы классификации дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Изучение выживаемости аскопор гибридов // Журнал общей биологии. Т. 44. № 5. С. 648–660.
6. Britten R. J., Pavich M., Smith J., 1970. A new method of DNA purification // Carnegie Inst. Wash. Year Book. Vol. 68. P. 400–402.
7. Fischer G., James S. A., Roberts I. N. Oliver S. G., Louis E. S., 2000. Chromosomal evolution in *Saccharomyces* // Nature. Vol. 405. P. 451–454.
8. Kaneko Y., Banno I., 1991. Reexamination of *Saccharomyces bayanus* strains by DNA–DNA hybridization and electrophoretic karyotyping // IFO Res. Comm. Vol. 15. P. 30–41.
9. Kurtzman C. P., Smiley M. J., Johnson C. J., Wick-erham L. J., Fuson G. B., 1980. Two closely related heterothallic species, *Pichia amylophylla* and *Pichia mississippiensis*: characterisation by hybridization and deoxyribonucleic acid reassociation // Int. J. Syst. Bacteriol. Vol. 30. P. 208–216.
10. Lemos G. A., Valente P., Pimental D., Hagler A. N., Mendonça-Hagler L. C., 1995. Characterization of *Saccharomyces paradoxus* and a new species of *Saccharomyces* from Brazilian ecosystem. // Abstracts of VII Int. Symp. Microb. Ecol. (ISME-7). Santos-São Paulo. Brazil. 27 August – 01 September. 1995. P. 215.
11. Naumov G. I., 1987. Genetic basis for classification and identification of the ascomycetous yeasts // Studies in Mycology. N 30. P. 469–475.
12. Naumov G. I., James S. A., Naumova E. S., Louis E. J., Roberts I. N., 2000. Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae* // Int. J. Syst. Evol. Microb. Vol. 50. P. 1931–1942.
13. Rodrigues de Sousa M., Madeira-Lopes A., Spencer-Martins I., 1995. The significance of active fructose transport and maximum temperature for growth in the taxonomy of *Saccharomyces sensu stricto* // System. Appl. Microbiol. Vol. 18. P. 44–51.
14. Sampaio J. P., Gonçalves P., 2008. Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus* // Appl. Environ. Microbiol. Vol. 74. N 7. P. 2144–2152.
15. Seidler R. J., Mandel M., 1971. Quantitative aspects of deoxyribonucleic acid renaturation: base composition, site of chromosome replication, and polynucleotide homologies // J. Bacteriol. Vol. 106. P. 608–614.

16. *Vaughan Martini A.*, 1989. *Saccharomyces paradoxus* comb. nov., a newly separated species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex based upon nDNA/nDNA homologies // *System. Appl. Microbiol.* Vol. 12. P. 179–182.
17. *Vaughan Martini A., Kurtzman C. P.*, 1985. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces sensu stricto* // *Int. J. Syst. Bacteriol.* Vol. 35. P. 508–511.
18. *Wang S.-A., Bai F.-Y.*, 2008. *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* Vol. 58. P. 510–514.
19. *Yamada Y., Mikata K., Banno I.*, 1993. Reidentification of 121 strains of genus *Saccharomyces* // *Bull. JFCC.* Vol. 9. P. 95–119.

#### ALLO- AND SYMPATRIC SIBLING SPECIES OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*: DNA–DNA REASSOCIATION

*Yu. V. Mikhailova, S. Castello, E. S. Naumova, G. I. Naumov*

✿ **SUMMARY:** Precise DNA–DNA reassociation data were obtained for new biological species *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* and *S. mikatae*, for the first time. The three species showed 25–51 % — of DNA–DNA reassociation with one another and with the known species *S. cerevisiae*, *S. bayanus* and *S. paradoxus*. Only in the combination *S. paradoxus* × *S. cariocanus* there was 99 % DNA–DNA homology. Despite high DNA–DNA reassociation value, the two yeasts are genetically isolated: their hybrids are sterile forming non-viable meiotic products (ascospores). Having four reciprocal translocations in its karyotype, *S. cariocanus* represents species in statu nascendi.

✿ **KEY WORDS:** populations; sibling species; *Saccharomyces* yeasts; genome homology; DNA–DNA reassociation.

#### ✿ Информация об авторах

*Михайлова Юлия Владимировна* — научный сотрудник.  
ГосНИИ генетика Роснаука.  
117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1  
E-mail: yuliya281279@yahoo.com

*Кастелло София* — научный сотрудник.  
Новый университет Лиссабона.  
Португалия, Капарика  
E-mail: sas@fct.unl.pt

*Наумова Елена Сергеевна* — заведующая сектором  
ГосНИИ генетика Роснаука.  
117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1  
E-mail: lena\_naumova@yahoo.com

*Наумов Геннадий Иванович* — заведующий лабораторией.  
ГосНИИ генетика Роснаука.  
117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1.  
E-mail: gnaumov@yahoo.com

*Mikhailova Yuliya Vladimirovna* — researcher.  
Scientific Center of Russian Federation  
Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms  
1-st Dorozhnyi pr., 1, 117545 Moscow, Russia  
E-mail: yuliya281279@yahoo.com

*Castello Sofia* — researcher.  
New University of Lisbon. Faculdade de Ciências e Tecnologia.  
2829-516 Caparica, Portugal.  
E-mail: sas@fct.unl.pt

*Naumova Elena Sergeevna* — head of the sector.  
Scientific Center of Russian Federation  
Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms  
1-st Dorozhnyi pr., 1, 117545 Moscow, Russia  
E-mail: lena\_naumova@yahoo.com

*Naumov Gennadiy Ivanovich* — head of the laboratory.  
Scientific Center of Russian Federation  
Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms  
1-st Dorozhnyi pr., 1, 117545 Moscow, Russia  
E-mail: gnaumov@yahoo.com