



© Г. И. Наумов

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

✿ Впервые показана принадлежность португальских штаммов к биологическому виду *Saccharomyces kudriavzevii* Naumov et al. (2000). Реидентификация проведена на основе гибридологического анализа. Ранее этот вид был описан на материале японских изолятов. Обсуждается дивергенция по молекулярным галактозным маркерам португальской и японской популяций *S. kudriavzevii*, а также различных популяций *S. cerevisiae*.

✿ **Ключевые слова:** популяции; биологический вид; дрожжи; *Saccharomyces kudriavzevii*; генетический анализ; дивергенция; мутации *gal*.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES KUDRIAVZEVII* ИЗ ЕВРОПЕЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время не вызывает сомнений, что естественным обитанием ближайших диких родственников культурных дрожжей рода *Saccharomyces* являются сокотечения и кора широколиственных деревьев, в особенности различных видов дубов Европы, Северной Америки и Дальневосточной Азии (Кудрявцев, 1954; Наумов, 1986; Наумов, Никоненко, 1988; Naumov et al., 1993, 1998; Wang, Bai, 2008). Векторами распространения этих дрожжей являются насекомые, в частности представители рода *Drosophila* (Naumov et al., 1996). Следует иметь в виду нахождение дрожжей *Saccharomyces* в лесной подстилке и самой почве (Наумов, 1979; Sniegowski et al., 2002; Глушакова и др., 2007). Принимая все это во внимание, можно утверждать, что дрожжи *Saccharomyces* являются компонентом биоценоза леса. Известны следующие биологические виды рода *Saccharomyces*, связанные в той или иной степени с деревьями: *S. paradoxus*, *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii* и *S. arboricolus*. Первые три вида — космополиты, тогда как три других до последнего времени считались эндемиками, соответственно, Японии и Китая. Дрожжи еще одного биологического вида *S. cariocanus* выделены из *Drosophila* в Бразилии. Неожиданным оказалось обнаружение в виноделии Европы межвидовых гибридов с участием *S. kudriavzevii* (Naumova et al., 2005; González et al., 2006). Недавно J. P. Sampaio и P. Gonçalves (2008), используя для изоляции дрожжей низкую температуру, обнаружили на коре дубов в Португалии штаммы, которые, возможно, относятся к виду *S. kudriavzevii*. Однако, проведенная молекулярная идентификация не может полностью исключить их межвидовое гибридное происхождение.

ЦЕЛЮ РАБОТЫ

На основе генетического анализа доказать существование в Европе биологического вида *S. kudriavzevii*, ассоциированного с корой дубов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования прежде всего служили три штамма *S. kudriavzevii*, выделенные (Sampaio, Gonçalves, 2008) с коры дубов в различных регионах Португалии: ZP 542, ZP 594 и ZP 629. Кроме того, мы реидентифицировали два новых японских штамма *S. kudriavzevii* (NBRC 10990, NBRC 10991), ранее изученных только молекулярными методами (Liti et al., 2005). Дрожжи культивировали и скрещивали при 27°С на полной агаризованной питательной среде

Поступила в редакцию 19.12.2008
Принята к публикации 27.01.2009

Таблица 1
Жизнеспособность аскоспор анализируемых штаммов *S. kudriavzevii*

№ штамма	Число изолированных тетрад	Число жизнеспособных аскоспор, %
ZP 542	11	96
ZP 594	10	75
594-2B*	7	96
ZP 629	8	56
629-5B*	8	88
NBRC 10990	7	89
NBRC 10991	9	75
10991-5B*	7	100
NBRC 1802		

* Отмечены моноспоровые культуры исходных штаммов

YPD. Споруляцию индуцировали через двое суток на стандартной ацетатной агаризованной среде. Аскоспоры изолировали с помощью стеклянной иглы микроманипулятора, предварительно разрушив оболочки асков ферментативным препаратом из желудка виноградных улиток *Helix pomatia*. Гибридизацию дрожжей осуществляли микроманипулятором методом «спора на спору» (Наумов и др., 1986).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для генетического анализа необходимо использовать высокофертильных гомозиготных родителей. Поэтому первым шагом было определение жизнеспособности аскоспор анализируемых штаммов и получение их моноспоровых культур с высокой выживаемостью аскоспор (табл. 1). Все пять штаммов *S. kudriavzevii* были гомоталличными. Штаммы ZP 542 и NBRC 10990 уже были высокофертильными. У штаммов ZP 594, ZP 629 и NBRC 10991 с пониженной выживаемостью аскоспор (56–75%) моноспоровые культуры были высокофертильны. Используя моноспоровые культуры, мы провели реидентификацию всех пяти штаммов генетическим анализом. Гибридизация с типовым штаммом *S. kudriavzevii* NBRC 1802 (табл. 2) подтверждает их принадлежность к роду *Saccharomyces*, а фертильность гибридов

и моногенное мейотическое расщепление контрольного маркера *lys/LYS* свидетельствует о принадлежности анализируемых штаммов как японского, так и португальского происхождения, к виду *S. kudriavzevii*.

Еще предстоит детальное молекулярно-генетическое изучение степени дивергенции европейской и японской популяций дрожжей *S. kudriavzevii*, однако уже имеются молекулярные маркеры, по которым эти две популяции различаются. Если дрожжи европейской популяции способны ассимилировать галактозу, а по нашей оценке и сбраживать ее, то японские штаммы не способны усваивать галактозу из-за обширных повреждений всех семи галактозных генов (Hittinger et al., 2004). Цитируемые авторы считают, что инактивация галактозных генов у японских дрожжей связана с изменением их экологической ниши — очевидно с отсутствием галактозы в местах обитания. Ранее аналогичный процесс мы наблюдали в определенных культурных популяциях дрожжей другого вида — *S. cerevisiae* (Наумов, Гудкова, 1978, 1979 а, б). Как правило, последние дрожжи сбраживают галактозу, однако штаммы *S. cerevisiae* вторичного виноделия (из игристых и хересных вин) не способны это делать. Генетический анализ показал, что у таких дрожжей происходит накопление мутантных аллелей трех генов *GAL*: *gal2*, *gal4*, *gal7*. Причем были обнаружены гетерозиготные штаммы *gal2/GAL2*, *gal4/GAL4*, одиночные мутанты — *gal2* и *gal4*, двойные — *gal2gal4* и даже тройные — *gal2gal4gal7*.

Принимая во внимание определенную молекулярно-генетическую дивергенцию португальских и японских штаммов *S. kudriavzevii*, а также наличие естественных межвидовых гибридов, есть основание рекомендовать генофонд этого вида как для фундаментальных эволюционных разработок, так и в селекционной программе с культурными дрожжами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор признателен Е. С. Наумовой за внимание к работе, а В. И. Кондратьевой и Е. В. Серповой за помощь в подготовке рукописи. Исследование было частично поддержано грантом РФФИ (06-04-49051).

Таблица 2

Генетический анализ гибридов различных штаммов *S. kudriavzevii* (ZP 542, ZP 594, ZP 629, NBRC 1802, NBRC 10990, NBRC 10991)

Происхождение гибридов*	Число скрещенных пар аскоспор	Число полученных зигот	Число изолированных тетрад	Жизнеспособность аскоспор	Расщепление контрольного маркера <i>lys:Lys</i>
542 × 1802	30	3	35	77	2:2 (14)**
594 × 1802	32	2	18	61	16:25
629 × 1802	43	4	28	63	35:34
10990 × 1802	44	2	22	90	2:2 (16)
10991 × 1802	41	1	23	80	2:2 (14)

* Во всех скрещиваниях использовали моноспоровые высокофертильные штаммы. Штамм NBRC 1802 был маркирован нами ауксотрофной мутацией *lys*.
** Здесь и далее в скобках приводится количество проанализированных тетрад

Литература

1. Глушакова А. М., Иванникова Ю. В., Наумова Е. С., Чернов И. Ю., Наумов Г. И., 2007. Массовое выделение и идентификация дрожжей *Saccharomyces paradoxus* из филлосферы растений // Микробиология. Т. 76. № 2. С. 236–242.
2. Кудрявцев В. И., 1954 Систематика дрожжей. -М.: изд. АН СССР, 427с.
3. Наумов Г. И., 1979. Биологический вид *Saccharomyces terrestris* // Докл. АН СССР. Т. 249. № 5. С. 1228–1230.
4. Наумов Г. И., 1986. Генетическая дифференциация и экология дрожжей *Saccharomyces paradoxus Batschinskaja* // Докл. АН СССР. Т. 291. № 3. С. 754–757.
5. Наумов Г. И., Гудкова Н. К., 1978. Идентификация мутаций, блокирующих утилизацию галактозы у дрожжей *Saccharomyces bayanus* // Докл. АН СССР. Т. 239. № 5. С. 1230–1232.
6. Наумов Г. И., Гудкова Н. К., 1979а. Сравнительная генетика дрожжей. Сообщение XVIII. Микроэволюция дрожжей *Saccharomyces bayanus* // Генетика. Т. 5. № 4. С. 605–614.
7. Наумов Г. И., Гудкова Н. К., 1979б. Регрессивная эволюция дрожжей *Saccharomyces* // Докл. АН СССР. Т. 245. № 2. С. 470–473.
8. Наумов Г. И., Кондратьева В. И., Наумова Е. С., 1986. Методы гибридизации гомоталлических дрожжей диплонтов и гаплонтов // Биотехнология. № 6. С. 33–36.
9. Наумов Г. И., Никоненко Т. А., 1988. Новые изоляты дрожжей *Saccharomyces paradoxus* из сокоотечений дуба // Научн. докл. высш. шк. Биол. науки. № 7. С. 84–87.
10. González S. S., Barrio E., Gafner J., Querol A., 2006. Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations // FEMS Yeast Res. Vol. 6. P. 1221–1234.
11. Hittinger C. T., Rokas A., Carroll S. B., 2004. Parallel inactivation of multiple GAL pathway genes and ecological diversification in yeasts // PNAS USA. Vol. 101. N 39. P. 14144–14149.
12. Liti G., Peruffo A., James S. A., Roberts I. A., Louis E. J., 2005. Inferences of evolutionary relationships from a population survey of LTR-retrotransposons and telomeric-associated sequences in the *Saccharomyces sensu stricto* complex // Yeast. Vol. 22. P. 177–192.
13. Naumov G. I., Naumova E. S., Azbukina Z. M., Korhola M., Gaillardin C., 1993. Genetic and karyotypic identification of *Saccharomyces* yeasts from Far East Asia // Cryptogamie, Mycol. Vol. 14. N 2. P. 85–93.
14. Naumov G. I., Naumova E. S., Sancho E. D., 1996. Genetic reidentification of *Saccharomyces* strains associated with black knot disease of trees in Ontario and *Drosophila* species in California // Can. J. Microbiol. Vol. 42. P. 335–339.
15. Naumov G. I., Naumova E. S., Sniegowski P. D., 1998. *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* are associated with exudates of North American oaks // Can. J. Microbiol. Vol. 44. P. 1045–1050.
16. 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. E. Vol. Microb. Vol. 50. P. 1931–1942.
17. Naumova E. S., Naumov G. I., Masneuf-Pomarede I., Naumova E. S., Naumov G. I., Masneuf-Pomarede I., Aigle M., Dubordieu D., 2005. Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae* // Yeast. Vol. 22. N 14. P. 1099–1115.
18. 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.
19. Sniegowski P. D., Dombrowski P. D., Fingerman E., 2002. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics // FEMS Yeast Res. Vol. 1. P. 299–306.
20. Wang S.-A., Bai F.-Y., 2008. *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark // Int. J. Syst. E. Vol. Microbiol. Vol. 58. P. 510–514.

Genetic identification of the yeast *Saccharomyces kudriavzevii* from European population

G. I. Naumov

☛ **SUMMARY:** Using genetic hybridization analysis we showed for the first time that Portuguese isolates belong to the biological species *Saccharomyces kudriavzevii* Naumov et al. (2000). Earlier this species was described on Japanese isolates. Divergence of Portuguese and Japanese *S. kudriavzevii* populations, as well as different *S. cerevisiae* populations, on molecular galactose markers is discussed.

☛ **KEY WORDS:** populations; biological species; yeasts; *Saccharomyces kudriavzevii*; genetic analysis; divergence; gal mutations.

☛ Информация об авторах

Наумов Геннадий Иванович — ведущий научный сотрудник. Государственный НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545 Россия, Москва, Первый Дорожный проезд, д. 1
E-mail: daniil_naumoff@genetika.ru

Naumov Gennadiy Ivanovich — senior researcher. State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, 117545 Russia, Moscow, Pervyi Dorozhnyi pass. 1
E-mail: daniil_naumoff@genetika.ru