

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ ГЕНОМЫ ХЕРЕСНЫХ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ ХАРАКТЕРИЗУЮТСЯ НИЗКОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬЮ

© 2019 г. М. А. Эльдаров¹, А. В. Белецкий¹, Н. В. Равин¹, А. В. Марданов¹, *

¹Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: mardanov@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 25.05.2018 г.

После доработки 12.07.2018 г.

Принята к публикации 23.07.2018 г.

Высокие концентрации этанола и окислительный стресс у хересных штаммов дрожжей могут оказывать мутагенное действие на их митохондриальные геномы (мтДНК). Проведен сравнительный анализ мтДНК винных и трех просеквенированных нами хересных штаммов дрожжей. МтДНК хересных штаммов отличаются высокой консервативностью нуклеотидных последовательностей и структуры. Число дестабилизирующих элементов мтДНК – GC-кластеров, коротких повторов, активных *ori*-участков у хересных штаммов в целом ниже, чем у винных. Консервативность мтДНК хересных штаммов может определяться как эффектами “бутылочного горлышка” в ходе эволюции, так и механизмами, направленными на поддержание генетической стабильности. В целом полученные данные не подтверждают гипотезу о повышенной генетической изменчивости митохондриальных геномов хересных штаммов дрожжей.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, мтДНК, сравнительная геномика, хересные дрожжи.

DOI: 10.1134/S0016675819050060

Хересные дрожжи – специализированная группа штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, используемая для получения биологически выдержанных вин [1]. Особенностью хересных дрожжей является их способность образовывать пленку на поверхности крепленого сброженного субстрата, при этом их метаболизм переключается с ферментативного на окислительный и образуются специфические для хересных вин ароматические соединения [1]. Физиологические и биохимические свойства хересных и винных штаммов весьма различны. Такие черты хересных дрожжей, как способность к пленкообразованию, устойчивость к высоким концентрациям этанола и ацетальдегида, оксидативному стрессу являются результатом адаптации и селекции [2]. Филогенетически хересные дрожжи представляют компактную группу, дочернюю по отношению к кладе винных штаммов [2].

Ядерные геномы хересных штаммов исследованы на уровне полиморфизма и варибельности числа копий отдельных локусов [3] и в последнее время – методами сравнительной геномики [4, 5]. При сравнении геномов хересных и винных штаммов были выявлены полиморфные аллели, идентифицированы геномные локусы и регуляторные сети, потенциально связанные с

адаптацией хересных штаммов к специфическим условиям роста [4].

Особенности митохондриальных ДНК (мтДНК) хересных штаммов дрожжей исследованы меньше. Было выдвинуто предположение, что их мтДНК отличается повышенной варибельностью за счет мутагенного действия высоких концентраций этанола (15% и выше) и ацетальдегида [6]. Также было показано, что перенос мтДНК хересного штамма в лабораторный штамм *S. cerevisiae* способен индуцировать у него повышенную устойчивость к этанолу, что указывает на наличие специфических адаптивных отличий в мтДНК хересных дрожжей [7].

Со времени расшифровки мтДНК референсного штамма *S. cerevisiae* [8] возможности сравнительной митогеномики дрожжей значительно расширились благодаря прогрессу технологий полногеномного секвенирования [9]. Анализ 100 расшифрованных митогеномов *S. cerevisiae* выявил специфические особенности мтДНК у отдельных географических популяций, различия в содержании интронов и мобильных элементов, сопоставил тенденции эволюции ядерных и митохондриальных геномов [10].

Ранее мы просеквенировали мтДНК трех штаммов хересных дрожжей из коллекции ВНИИВиВ

Таблица 1. Характеристики митохондриальных геномов хересных и винных штаммов дрожжей

	Штамм	Номер в GenBank	Длина мтДНК, пн	Кодирующие участки, % ¹	GC, %	Вариабельность					
						весь митогеном			гены митобелков и рРНК ²		
						S	S_i	π	S	S_i	π
Хересные	I-30	MG269479	87571	21.66	15.7	620	4707	0.00431	41	10	0.00198
	I-329	MG269481	80204	19.94	15.5						
	I-566	MG269480	80886	19.69	15.7						
	YJM270	CP006479	82331	16.94	15.7						
Винные	YJM453	CP006486	82494	20.50	16.2	3145	10432	0.02538	91	182	0.00456
	YJM975	CP006500	78950	17.64	16.1						
	YJM1244	CP006516	83285	21.50	16.2						
	YJM1450	CP006553	76603	17.12	15.1						

Примечание. S – число сегрегирующих сайтов, S_i – число сайтов инделей, π – нуклеотидное разнообразие [20].

¹ Включают ОРС (в том числе интронные), рРНК, тРНК, гnrS.

² *atp6*, *atp8*, *atp9*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *cob*, *rns*, *rnl*.

“Магарач” [11]. Задача настоящей работы – сравнительный анализ митохондриальных геномов хересных и винных штаммов дрожжей.

Для сравнительного анализа использовали последовательности мтДНК хересных и винных штаммов (табл. 1). Дополнительно для оценки полиморфизма митохондриальных генов использовали первичные данные секвенирования геномов хересных дрожжей из базы SRA NCBI (ERR560552, ERR560553, ERR560548, ERR560540, ERR560546, ERS485776, ERR560549). Короткие чтения очищали с помощью Sickle 1.33 [12] и затем собирали в контиги с помощью SPAdes. Для множественного выравнивания применяли программы MAFFT v. 7 [13] и multi-LAGAN [14]. Для поиска GC-кластеров использовали программу FIMO [15] и описанные ранее последовательности элементов отдельных классов [10]. Для поисков вариантов участков *ori* использовали программу MCAST поиска повторов – сервер REPuter [16]. Для анализа полиморфизма последовательностей мтДНК использовали пакет программ DnaSP 6 [17]; для построения блочных диаграмм – приложение BoxPlotR (<http://shiny.chemgrid.org/box-plotr/>). Сравнение последовательностей генов *cox1* и *cob* проводили с помощью BLASTN.

Митохондриальные геномы хересных и винных штаммов близки по размеру, GC-составу, доле кодирующих участков (табл. 1). Все расшифрованные митогеномы хересных штаммов кодируют специфичный для *S. cerevisiae* набор митобелков и РНК – три субъединицы цитохромоксидазы (*cox1*, *cox2*, *cox3*), цитохром *b* (*cob*), три субъединицы АТФазы (*atp8*, *atp6*, *atp9*), один белок и две РНК митохондриальных рибосом (*rps3*,

rns, *rnl*), 24 тРНК и РНК-субъединицу РНКазы Р. Порядок генов в митогеномах хересных штаммов такой же, как и в мтДНК референсного штамма *S. cerevisiae* S288C, и прерывается лишь несинтенными инсерциями открытых рамок считывания (ОРС) эндонуклеаз/матураз семейства LADLIDAG (рис. 1,а).

Сравнительный анализ мтДНК хересных и винных штаммов указывает на более высокую степень консерватизма геномов хересных штаммов по сравнению с винными (табл. 1), выявляет участки повышенной изменчивости, различные инсерции и делеции (рис. 1,а). В мтДНК хересных штаммов интроны локализованы исключительно в генах *cox1* и *cob1*, причем набор интронов и сайты их интеграции идентичны. В интронах гена *cox1* локализованы три ОРС, кодирующие эндонуклеазы и матуразы (рис. 1,б). Такой “хересный” вариант гена *cox1* встречается еще только у двух из более чем 160 секвенированных мтДНК дрожжей (штаммы Yjm1526 и Yjm1249).

Для оценки характера возможного действия отбора сравнивали последовательности белок-кодирующих генов в мтДНК у хересных штаммов, используя как полногеномные данные, так и данные первичного секвенирования. Информативность подхода в целом оказалась невысока из-за низкой вариабельности последовательностей. Число полиморфных сайтов для *atp6*, *atp8*, *atp9*, *cob1* составило 0–2, для *cox1*, *cox2*, *cox3* – 6–11. Значение критерия D Таджими оказалось отрицательным, но статистически незначимым для всех последовательностей, кроме *cox1*. Для *cox1* значение критерия D составило –1.31 при значении $P < 0.001$, что свидетельствует о вероятном

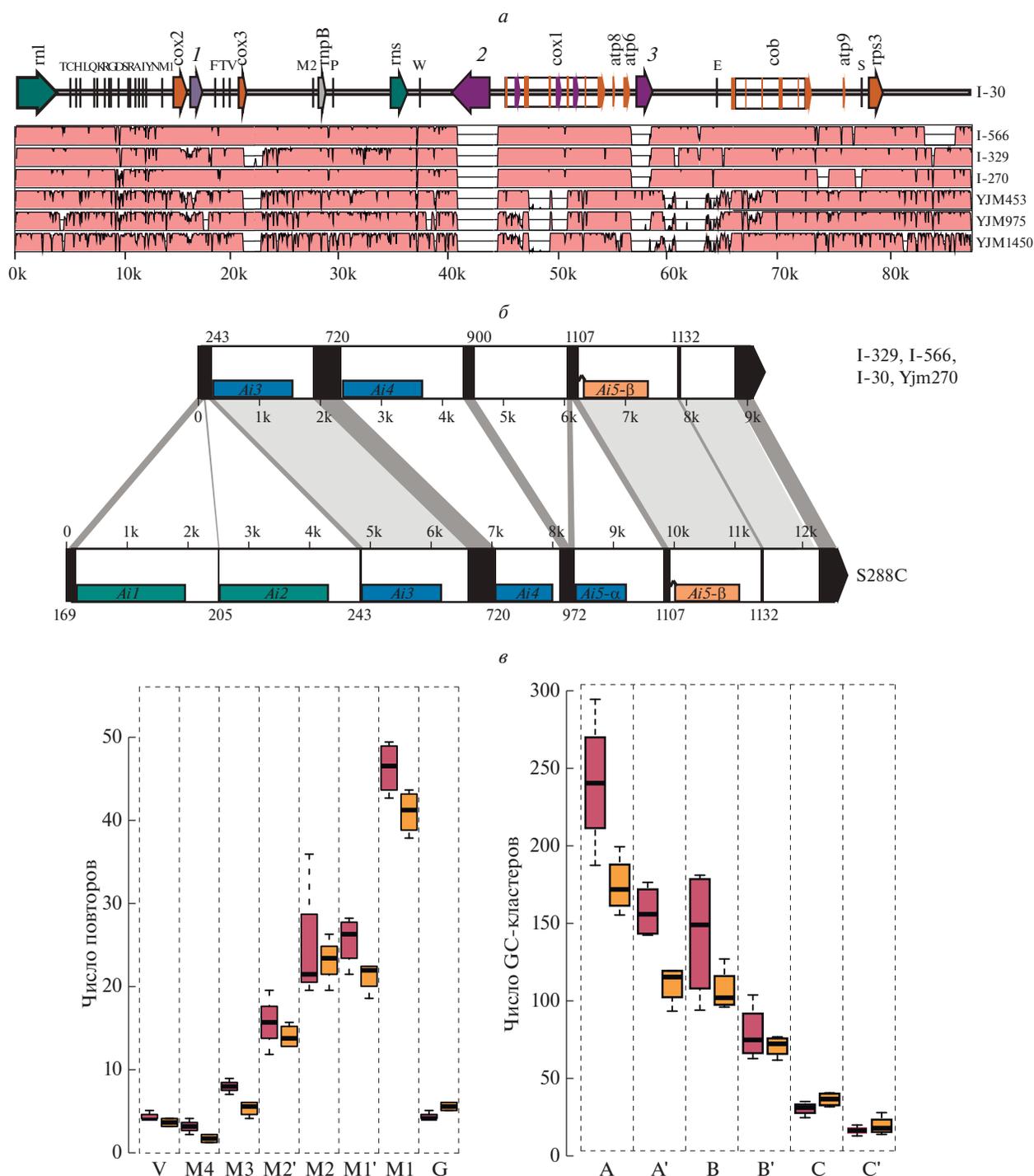


Рис. 1. Генетическая организация и вариабельность мтДНК хересных штаммов дрожжей. *a* – обобщенная генетическая карта мтДНК хересных штаммов и распределение консервативных и вариабельных участков. Зеленые стрелки – гены рРНК, кирпичные – ОПС митобелков, фиолетовые – ОПС нуклеаз/матураз (*I* – инсерция LADLIDAG ОПС в штаммах I-30, I-566; 2 и 3 – только в штамме I-30). Гены тРНК – черные прямоугольники с буквенным обозначением аминокислотной специфичности. В нижней части показано сравнение мтДНК штамма I-30 с другими митогеномами. Розовая заливка – консервативные участки, шкала сходства нуклеотидных последовательностей от 50 до 100%; *b* – экзон-интронная структура гена *cox1*. Гены обозначены рамками, черные прямоугольники – экзоны, цифры с внешней стороны – позиции интронов относительно кодирующей последовательности *cox1*, цифры с внутренней стороны – координаты в гене *cox1* (k = 1000 пн). Номенклатура интронных ОПС дана в соответствии с [19]. Зеленые прямоугольники – ревертазы, синие – эндонуклеазы, оранжевые – матуразы. Серые полосы – участки гомологии; *в* – GC-кластеры и повторы в мтДНК. Центральная линия – медианное значение, верхние и нижние границы “ящичков” – 25-й и 75-й процентиля. Малиновым цветом выделены винные штаммы, оранжевым – хересные. Правая панель – распределение GC-кластеров. Номенклатура кластеров дана в соответствии с [10]. Левая панель – распределение повторов. A, B, C – прямые повторы, A', B', C' – инвертированные. Размеры: A, A' – 30–40 пн; B, B' – 41–60 пн; C, C' – более 61 пн.

действию стабилизирующего отбора на данный локус.

Предыдущие исследования структурной организации мтДНК сахаромицетов выявили внутри- и межвидовые различия в представленности таких генетических элементов, как прямые и инвертированные повторы, GC-кластеры, участки начала репликации [10, 18]. Мобильные GC-кластеры являются важным источником инсерционно-делеционного полиморфизма мтДНК дрожжей. Эти последовательности длиной 30–80 нуклеотидов разделяют на семь классов [10, 18], в сумме число их копий ~120 на геном. Наиболее представленными у хересных и винных штаммов оказались элементы классов M1 и M2 (рис. 1, в), при этом частота элементов почти всех классов у хересных штаммов ниже.

Другой известный источник генетической нестабильности мтДНК дрожжей – короткие прямые и инвертированные повторы. В митогеномах хересных штаммов оказалось снижено число коротких повторов размером 30–40 и 41–60 пн (рис. 1, в).

Предполагаемые участки начала репликации у *S. cerevisiae* определяются набором трех регулярно расположенных консенсусных мотивов GGGG-GAGGGGGTGGGTGAT, GGGTCCC и GGGAC-CC, разделенных двумя AT-богатыми участками размером около 200 пн. Эти локусы размером порядка 270 пн располагаются сразу после 20 пн промоторного участка [19], причем некоторые из *ori*-элементов у штамма S288C инактивированы вследствие инсерции GC-элемента в промотор [18]. У винных штаммов мы обнаружили в среднем шесть потенциально “активных” и 5.25 “инактивированных” *ori* на митогеном, для хересных штаммов это соотношение 4.8 и 7.5 соответственно. Поскольку наличие активных *ori* является условием накопления дефектных укороченных молекул мтДНК, можно предполагать, что снижение числа активных *ori* у хересных штаммов может являться одним из факторов повышения стабильности их митогеномов [9].

Консервативность последовательностей белок-кодирующих генов и экзон-интронной структуры генов *cox1* и *cob1* у хересных штаммов может определяться как эффектами “бутылочного горлышка” в ходе эволюции, так и механизмами, направленными на поддержание генетической стабильности мтДНК [9]. Сходные механизмы могут объяснять наблюдаемое у хересных штаммов снижение числа дестабилизирующих элементов митогеномов, GC-кластеров, коротких повторов, активных *ori*-участков.

Таким образом, полученные данные не подтверждают ранние гипотезы о повышенной генетической изменчивости митохондриальных геномов хересных штаммов дрожжей.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 16-16-00109).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alexandre H. Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae* – Their ecology, genetics and metabolism // Int. J. Food Microbiol. 2013. V. 167. № 2. P. 269–275.
2. Legras J.L., Moreno-Garcia J., Zara S. et al. Flor Yeast: New perspectives beyond wine aging // Front. Microbiol. 2016. V. 7. P. 503.
3. Legras J.L., Erny C., Charpentier C. Population structure and comparative genome hybridization of European flor yeast reveal a unique group of *Saccharomyces cerevisiae* strains with few gene duplications in their genome // PLoS One. 2014. V. 9. № 10. P. e108089.
4. Coi A.L., Bigey F., Mallet S. et al. Genomic signatures of adaptation to wine biological ageing conditions in biofilm-forming flor yeasts // Mol. Ecol. 2017. V. 26. № 7. P. 2150–2166.
5. Eldarov M.A., Beletsky A.V., Tanashchuk T.N. et al. Whole-genome analysis of three yeast strains used for production of sherry-like wines revealed genetic traits specific to flor yeasts // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 965.
6. Castrejón F., Codón A.C., Cubero B. et al. Acetaldehyde and ethanol are responsible for mitochondrial DNA (mtDNA) restriction fragment length polymorphism (RFLP) in flor yeasts // Syst. Appl. Microbiol. 2002. V. 25. № 3. P. 462–467.
7. Ibeas J.I., Jimenez J. Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces* flor yeasts // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. № 1. P. 7–12.
8. Foury F., Roganti T., Lecrenier N., Purnelle B. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae* // FEBS Lett. 1998. V. 440. № 3. P. 325–331.
9. Freel K.C., Friedrich A., Schacherer J. Mitochondrial genome evolution in yeasts: an all-encompassing view // FEMS Yeast Res. 2015. V. 15. № 4. P. fov023.
10. Wolters J.F., Chiu K., Fiumera H.L. Population structure of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae* // BMC Genomics. 2015. V. 16. № 1. P. 451.
11. Mardanov A.V., Beletsky A.V., Eldarov M.A. et al. Complete mitochondrial genomes of three *Saccharomyces cerevisiae* flor strains // Mitochondrial DNA Part B: Resources. 2017. V. 2. № 2. P. 849–850.
12. Joshi N.A., Fass J.N. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files: Version 1.33 (Software). 2011.
13. Katoh K., Standley D.M. MAFFT: Iterative refinement and additional methods // Methods Mol. Biol. 2014. V. 1079. P. 131–146.
14. Brudno M., Do C.B., Cooper G.M. et al. LAGAN and multi-LAGAN: efficient tools for large-scale multiple alignment of genomic DNA // Genome Res. 2003. V. 13. № 4. P. 721–731.
15. Bailey T.L., Boden M., Buske F.A. et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching // Nucl. Acids Res. 2009. V. 37. P. W202–W208.

16. Kurtz S. REPuter: the manifold applications of repeat analysis on a genomic scale // Nucl. Acids Res. 2001. V. 29. № 22. P. 4633–4642.
17. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. V. 25. № 11. P. 1451–1452.
18. Sulo P., Szabóová D., Bielik P. et al. The evolutionary history of *Saccharomyces* species inferred from completed mitochondrial genomes and revision in the “yeast mitochondrial genetic code” // DNA Res. 2017. V. 24. № 6. P. 571–583.
19. Turk E.M., Das V., Seibert R.D., Andrulis E.D. The mitochondrial RNA landscape of *Saccharomyces cerevisiae* // PLoS One. 2013. V. 8. № 10. P. e78105.
20. Nei M., Li W.H., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 10. P. 5269–5273.

Mitochondrial Genomes of Flor Yeast Strains Are Characterized by a Low Genetic Variability

M. A. Eldarov^a, A. V. Beletsky^a, N. V. Ravin^a, and A. V. Mardanov^{a, *}

^a*Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

^{*}*e-mail: mardanov@biengi.ac.ru*

Flor yeasts represent a specialized group of *Saccharomyces cerevisiae* strains capable to form a biofilm on the surface of the wine and used for biological wine ageing. High concentrations of ethanol and oxidative stress can make a mutagenic effect on their mitochondrial genomes (mtDNA). We performed a comparative analysis of the mtDNAs of the wine strains and three flor yeast strains sequenced by us. mtDNA of flor strains are characterized by high conservation of nucleotide sequences and structure. The numbers of destabilizing elements of mtDNA (GC-clusters, short repeats, active ori sites) in flor strains are generally lower than that in wine yeasts. The stability of mtDNA of flor strains can be determined both by the effects of the “bottleneck” in the course evolution, and by mechanisms aimed at maintaining genetic stability. On the whole, the data obtained do not support the hypothesis of increased genetic variability of the mitochondrial genomes of flor yeast strains.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, mtDNA, comparative genomics, flor yeasts.