

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ДРОЖЖЕЙ *KLUYVEROMYCES DOBZHANSKII*

© 2021 г. Е. С. Наумова^а, *, Ч.-Ф. Ли^б, Г. И. Наумов^а

^аГосударственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов
Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Москва, 117519 Россия

^бDepartment of Applied Science, National Tsing Hua University of Education, Hsinchu, 30014 Taiwan

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Поступила в редакцию 03.03.2021 г.

После доработки 10.03.2021 г.

Принята к публикации 11.03.2021 г.

На материале штаммов различного экологического и географического происхождения изучен внутривидовой полиморфизм диких дрожжей *Kluyveromyces dobzhanskii* – ближайших родственников культурных молочных дрожжей *K. lactis* и *K. marxianus*. С помощью микросателлитного типирования, филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1/ITS2 и митохондриального гена *COX2* установлено, что вид *K. dobzhanskii* имеет сложный состав и представлен, по крайней мере, тремя географическими популяциями: североамериканской (включая типовую культуру CBS 2104), европейской и дальневосточной. Штаммы различного географического происхождения характеризуются уникальными нуклеотидными заменами в ITS1/ITS2-участке и митохондриальном гене *COX2*. У европейских штаммов обнаружена корреляция (GTG)₅-профилей с источником выделения. Штаммы, изолированные в Испании из насекомых, имеют уникальные паттерны.

Ключевые слова: дрожжи *Kluyveromyces dobzhanskii*, микросателлитный маркер (GTG)₅, филогенетический анализ, внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2, митохондриальный ген *COX2*

DOI: 10.31857/S0026365621040121

Дрожжи *Kluyveromyces* – второй по значимости после *Saccharomyces* объект фундаментальных и прикладных исследований. Они имеют большое биотехнологическое значение и используются для производства различных гетерологичных белков медицинского и пищевого значения, а также в качестве биологических агентов, подавляющих развитие вредных микроорганизмов, и продуцентов биоэтанола из лигноцеллюлозных отходов сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности (Fonseca et al., 2008; Suzuki et al., 2014). В настоящее время род *Kluyveromyces* включает семь видов: наземные *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. dobzhanskii* и *K. wickerhamii*, а также морские *K. aestuarii*, *K. nonfermentas* и *K. siamensis* (Kurtzman, 2003, Lachance, 2011). Дрожжи *K. lactis* и *K. marxianus* – постоянные компоненты различных молочнокислых продуктов и могут использоваться в качестве пробиотических микроорганизмов (Massaferrì et al., 2012; Romanin et al., 2016; Наумова и соавт., 2017). Их ближайшим филогенетическим родственником являются дикие дрожжи *K. dobzhanskii*, которые распространены во многих частях света и выделяются исключительно из природных источников: растений, насекомых, почвы, шляпочных грибов

и др. Эти дрожжи представляют собой удобную модель для популяционно-генетических исследований. В отличие от молочных штаммов *Kluyveromyces*, дрожжи *K. dobzhanskii* практически не изучены. Имеющиеся в литературе сведения по электрофорезу изоферментов и ПДРФ-анализу митохондриальной ДНК отдельных штаммов указывают на возможную генетическую гетерогенность вида *K. dobzhanskii* (Sidenberg, Lachance, 1986; Belloch et al., 1997).

Современная классификация аскомицетовых дрожжей основана на филогенетическом анализе нуклеотидных последовательностей ряда молекулярных маркеров (баркодов), прежде всего домена D1/D2 гена 26S рРНК и 5.8S–ITS-фрагмента, включающего ген 5.8S РНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1/ITS2 (Kurtzman, Robnett, 1998; Kurtzman, 2003). ITS-район характеризуется значительной межвидовой дивергенцией, его длина постоянна у штаммов одного и того же вида, а последовательность может варьировать (James et al., 1998). Поэтому этот участок рДНК используется не только для разделения близкородственных видов, но и для изучения генетической изменчивости дрожжей на популяци-

онном уровне. Используемый в современной таксономии дрожжей митохондриальный ген *COX2* обладает значительной вариабельностью и больше подходит для дифференциации отдельных штаммов, чем для разграничения видов. На ряде грибных таксонов отмечено, что видовая филогения, построенная на основании анализа ядерных и митохондриальных генов, может не совпадать (Schoch et al., 2012; Vu et al., 2016).

Микросателлитные маркеры имеют множественную локализацию в геноме дрожжей, что позволяет сравнивать большое количество полиморфных локусов. На дрожжах *Saccharomyces* было показано, что с помощью микросателлитного маркера (GTG)₅ можно дифференцировать отдельные виды этого рода, а также идентифицировать отдельные штаммы (Baleiras Couto et al., 1996; Naumova et al., 2000, 2011). Ранее мы использовали этот маркер для изучения внутривидового полиморфизма дрожжей *K. lactis* (Наумова и соавт., 2005).

Целью настоящей работы было изучение молекулярного полиморфизма дрожжей *K. dozhzhanskii* на материале штаммов различного экологического и географического происхождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы и среды. Используемые в работе штаммы и их происхождение представлены в табл. 1. Дрожжи культивировали при 28°C на полной среде YPD (г/л): бакто-агар (“Difco”, США) – 20; глюкоза (“Merck”, Германия) – 20; дрожжевой экстракт (“Difco”) – 10; бакто-пептон (“Difco”) – 20.

Полимеразную цепную реакцию осуществляли на ДНК-амплификаторе “Bio-Rad” (США). Дрожевую ДНК выделяли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (“Fermentas”, Литва). Для амплификации домена D1/D2 гена 26S рРНК и 5.8S-ITS-фрагмента (ген 5.8S РНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1/ITS2) использовали стандартные праймеры (Kurtzman, Robnett, 2003), а для амплификации митохондриального гена *COX2* использовали праймеры COX23 (5'-GGTATTTTGAATTCATGA-3') и COX25 (5'-ATTATTTGTTTCGTTTAAATCA-3') (Belloch et al., 2000). ПЦР проводили в 30 мкл буфера, содержащего 2.5 мМ MgCl₂, 0.1 мМ каждого дНТФ, 50 пмоль каждого праймера, 2.5 единицы *Taq*-полимеразы (“Синтол”, Россия), 20–200 нг ДНК. Начальную денатурацию осуществляли при 94°C в течение 3 мин, затем 30 циклов в следующем режиме: денатурация при 94°C, 45 с; отжиг праймеров при 52°C, 30 с; синтез ДНК при 72°C, 120 с; конечная достройка при 72°C, 10 мин. Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 1%-ном агарозном геле при 60–65 В в 0.5× ТВЕ буфере (45 мМ трис,

10 мМ ЭДТА, 45 мМ борная кислота; рН 8.0) в течение 2 ч.

Амплификацию ДНК с микросателлитным праймером (GTG)₅ проводили в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 3 мМ MgCl₂, 0.3 мМ дНТФ, 1.25 ед. акт. *Taq*-полимеразы (“Синтол”, Россия), 30 пмоль праймера, 20–200 нг анализируемой геномной ДНК. ПЦР (30 циклов) осуществляли в режиме: денатурация ДНК при 94°C, 30 с; отжиг праймера при 52°C, 30 с; синтез ДНК при 72°C, 1 мин. Разделение амплифицированной ДНК проводили в 1.6%-ном агарозном геле при 55–60 В в 0.5× ТВЕ в течение 3.5–4 ч.

Гели окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция). В качестве маркера молекулярных весов использовали препарат 1 kb DNA Ladder (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Секвенирование. Амплифицированные фрагменты домена D1/D2, 5.8S-ITS-фрагмента и гена *COX2* элюировали из геля с помощью набора Silica Beads DNA Gel Extraction Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США), согласно протоколу фирмы-изготовителя. Нуклеотидные последовательности домена D1/D2, 5.8S-ITS-участка и гена *COX2* определяли по двум цепям с помощью прямого секвенирования по методу Сенгера на автоматическом секвенаторе “Applied Biosystems 3730” (США).

Филогенетический анализ. Полученные нуклеотидные последовательности анализировали при помощи программы SeqMan package (“DNA Star Inc.”, США). Поиск гомологии с известными нуклеотидными последовательностями проводили в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) с помощью программы BLAST. Множественное выравнивание изученных нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием программы BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Филогенетические деревья строили методом объединения соседей (Neighbor-Joining) в программе MEGA 7 (Kumar et al., 2013). В качестве внешней группы использовали типовую культуру дрожжей *Kluveromyces marxianus* CBS 712. Индексы бутстрепа, определяющие статистическую достоверность выделения групп, определяли для 1000 псевдореплик.

Филогенетические связи между штаммами *K. dozhzhanskii* устанавливали также путем сравнения профилей ПЦР-продуктов, амплифицированных с микросателлитным праймером (GTG)₅. Дендрограмму, основанную на матрице различий по (GTG)₅-профилям, строили с помощью программы Neighbor-Joining из компьютерного пакета TREECON (van der Peer, de Wachter, 1994). Индексы бутстрепа, определяющие статистическую достоверность выделения групп, определяли для 100

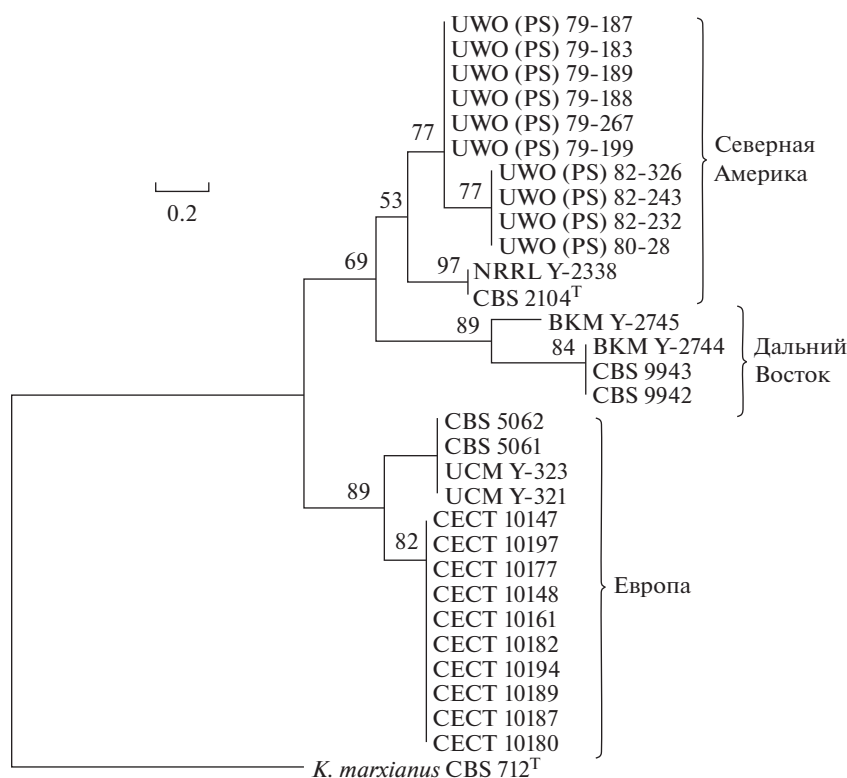


Рис. 1. Дендрограмма родства штаммов *Kluyveromyces dobzhanskii*, основанная на матрице различий по ПЦР-профилям с микросателлитным праймером (GTG)₅. В качестве внешней группы использовали типовую культуру *K. marxianus* CBS 712. Приводятся значения бутстрепа >50%. Т – типовая культура.

псевдореплик. В качестве внешней группы использовали типовую культуру дрожжей *K. marxianus* CBS 712.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объектом исследования служили 29 штаммов *Kluyveromyces*, выделенные из различных природных источников в Европе, Северной Америке и на Дальнем Востоке России (табл. 1). Штаммы получены из отечественных и международных коллекций. Согласно нуклеотидным последовательностям домена D1/D2 26S рДНК, все изученные штаммы относятся к виду *K. dobzhanskii*. В качестве контроля была использована типовая культура CBS 2104, выделенная из *Drosophila pseudoobscura* в США. Генетическое родства штаммов *K. dobzhanskii* различного происхождения изучали с помощью микросателлитного типирования и филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей 5.8S-ITS участка и митохондриального гена *COX2*.

ПЦР с микросателлитным праймером (GTG)₅. ПЦР-профили изученных штаммов *K. dobzhanskii* значительно отличались от паттерна тест-штамма *K. marxianus* CBS 712 (рисунок не приводится). На основании полученных (GTG)₅-профилей

была построена дендрограмма (рис. 1). Штаммы *K. dobzhanskii* сформировали отдельный кластер относительно тест-штамма *K. marxianus* CBS 712. Внутри этого кластера выделяются три четкие группы, объединяющие штаммы с наиболее похожими паттернами. Внутри каждой группы обнаружена вариация по ПЦР-профилям, проявляющаяся в наличии или отсутствии отдельных фрагментов.

Первую группу сформировали североамериканские штаммы. Внутри этой группы выделяются три подгруппы. Первая включает типовую культуру CBS 2104 и штамм NRRL Y-2338 (США), а остальные две подгруппы представлены канадскими изолятами. Следует отметить, что штаммы, выделенные из галлов *Prunus virginiana* в 1979 г., отличаются по (GTG)₅-паттернам от остальных канадских штаммов. Европейские штаммы объединились во вторую группу, при этом изолированные из различных насекомых в Испании штаммы отличались по ПЦР-профилям от штаммов, выделенных с поверхности грибов во Франции (CBS 5061, CBS 5062) и листьев дуба на Украине (UCM Y-321, UCM Y-323). Дальневосточные изоляты CBS 9942, CBS 9943, ВКМ Y-2744 и ВКМ Y-2745 сформировали третью группу (рис. 1).

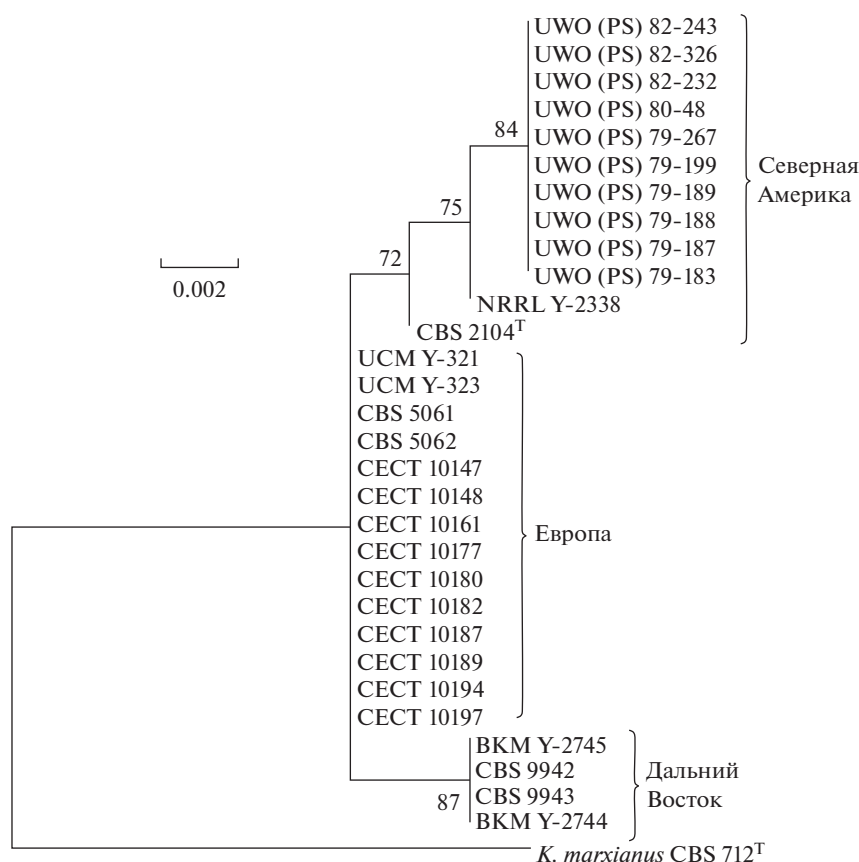


Рис. 2. Филогенетическое родство штаммов *Kluyveromyces dobzhanskii* различного географического происхождения, основанное на анализе нуклеотидных последовательностей 5.8S-ITS-фрагмента рДНК. Приводятся значения бутстрапа >50%. Шкала соответствует 2 нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. В качестве внешней группы использовали типовую культуру *K. marxianus* CBS 712. Т – типовая культура.

Таким образом, обнаружена корреляция (GTG)₅-паттернов с географическим происхождением штаммов, а для европейских штаммов и с источником выделения.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей 5.8S-ITS-фрагмента рДНК. Мы провели секвенирование 5.8S-ITS-района у 26 изученных штаммов. У трех европейских штаммов (SECT 10177, SECT 10180, SECT 10187) нуклеотидные последовательности этого участка рДНК были определены ранее (Belloch et al., 2002). Полученные нуклеотидные последовательности сравнили между собой и с последовательностями 5.8S-ITS-участка типовой культуры *K. dobzhanskii* CBS 2104, а также тест-штамма *K. marxianus* CBS 712.

На основании полученных нуклеотидных последовательностей было построено филогенетическое древо, на котором выделяются три группы штаммов (рис. 2). Первая группа образована североамериканскими штаммами. Десять канадских штаммов имеют идентичные нуклеотидные последовательности 5.8S-ITS-участка, которые отличаются одной заменой от штамма NRRL Y-2338 и

двумя заменами от CBS 2104, соответственно, в 69 и 199 позициях (нумерация приводится по последовательности типовой культуры CBS 2104). Вторую группу сформировали 14 европейских штаммов, имеющих идентичные 5.8S-ITS-последовательности. Дальневосточные штаммы CBS 9942, CBS 9943, BKM Y-2745 и BKM Y-2744, также имеющие идентичные последовательности, вошли в третью группу. Различия по 5.8S-ITS-последовательностям между штаммами трех групп составили от трех до пяти нуклеотидных замен. В то же время, 5.8S-ITS-последовательности штаммов *K. dobzhanskii* и типовой культуры *K. marxianus* CBS 712 различаются более чем 20 нуклеотидными заменами.

Штаммы различного географического происхождения характеризуются уникальными нуклеотидными заменами. В отличие от североамериканских штаммов, у всех европейских и дальневосточных штаммов имеется замена нуклеотида G на A в 41 позиции. Дальневосточные штаммы характеризуются двумя дополнительными транзициями G–A в 38 и 564 позициях.

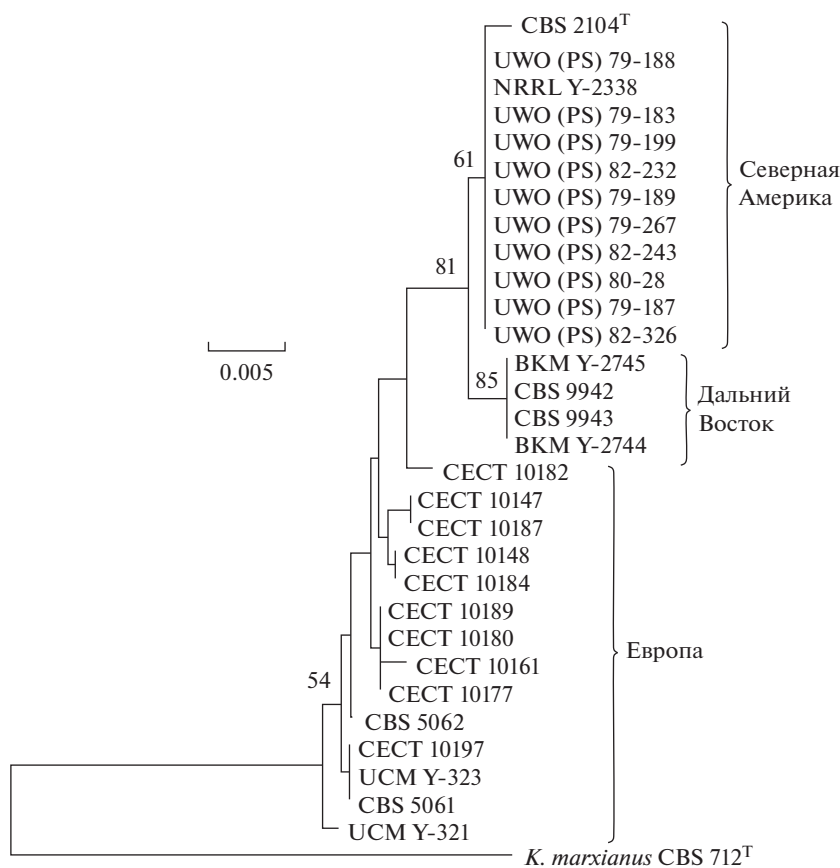


Рис. 3. Филогенетическое родство штаммов *Kluveromyces dobzhanskii* различного географического происхождения, основанное на анализе нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *COX2*. Приводятся значения бутстрепа >50%. Шкала соответствует 5 нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. В качестве внешней группы использовали типовую культуру *K. marxianus* CBS 712. Т – типовая культура.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *COX2*. У 29 изученных штаммов была определена нуклеотидная последовательность фрагмента гена *COX2* размером 585 п.н. Полученные последовательности сравнили с последовательностями гена *COX2* типовых культур *K. dobzhanskii* CBS 2104 и *K. marxianus* CBS 712, имеющимися в GenBank. На основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей было построено филогенетическое древо (рис. 3).

Изученные штаммы *K. dobzhanskii* разделились на три кластера. В первый кластер вошли североамериканские изоляты. Одиннадцать штаммов имели идентичные последовательности гена *COX2* и отличались от типовой культуры CBS 2104 одной нуклеотидной заменой. Второй кластер образовали четыре дальневосточных штамма, имеющие идентичные последовательности. Европейские штаммы сформировали третий кластер. Этот кластер является наиболее гетерогенным, входящие в него 14 европейских штаммов различаются 2–7

нуклеотидными заменами. Несмотря на указанные различия, все 14 европейских штаммов характеризуются двумя уникальными заменами: трансверсией Т–А и транзицией С–Т соответственно, в 177 и 182 позициях (нумерация приводится по последовательности типовой культуры CBS 2104). Дальневосточные штаммы имеют уникальную замену С–Т в пятой позиции. Различия в последовательностях гена *COX2* европейских и остальных штаммов *K. dobzhanskii* составили от 8 до 11 замен, а различия с последовательностью этого гена типовой культуры *K. marxianus* CBS 712 превышали 28 нуклеотидов.

Полученные данные свидетельствуют о значительном полиморфизме дрожжей *K. dobzhanskii*, связанным с географическим происхождением штаммов. Результаты, полученные с помощью микросателлитного типирования, филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1/ITS2 и митохондриального гена *COX2*, хорошо согласуются. По всем трем молекулярным маркерам изу-

Таблица 1. Изученные штаммы дрожжей *Kluyveromyces dobzhanskii* и их происхождение

| Штамм | Источник выделения | Место выделения |
|-----------------|---------------------------------|---------------------|
| CBS 2104 (T) | <i>Drosophila pseudoobscura</i> | США |
| СЕСТ 10147 | <i>Euoxa segetum</i> | Испания |
| СЕСТ 10148 | <i>Noctua pronuba</i> | Испания |
| СЕСТ 10161 | <i>Trigonophora meticulosa</i> | Испания |
| СЕСТ 10177 | <i>Noctua pronuba</i> | Испания |
| СЕСТ 10180 | <i>Taenicompa gotica</i> | Испания |
| СЕСТ 10182 | <i>Noctua pronuba</i> | Испания |
| СЕСТ 10187 | <i>Synvaleria jaspidea</i> | Испания |
| СЕСТ 10189 | <i>Synvaleria jaspidea</i> | Испания |
| СЕСТ 10194 | <i>Antitype flavicincta</i> | Испания |
| СЕСТ 10197 | <i>Rhizotype venusta</i> | Испания |
| CBS 5061 | <i>Hymenochaete rubiginosa</i> | Франция |
| CBS 5062 | <i>Fistulina hepatica</i> | Франция |
| NRRL Y-2338 | Папоротник | США |
| UCM Y-321 | Листья, <i>Quercus</i> sp. | Украина |
| UCM Y-323 | Листья, <i>Quercus</i> sp. | Украина |
| UWO (PS) 79-183 | Галл, <i>Prunus virginiana</i> | Мельбурн, Канада |
| UWO (PS) 79-187 | Галл, <i>Prunus virginiana</i> | Мельбурн, Канада |
| UWO (PS) 79-188 | Галл, <i>Prunus virginiana</i> | Мельбурн, Канада |
| UWO (PS) 79-189 | Галл, <i>Prunus virginiana</i> | Мельбурн, Канада |
| UWO (PS) 79-199 | Галл, <i>Prunus virginiana</i> | Пинери, Канада |
| UWO (PS) 79-267 | Галл, <i>Prunus virginiana</i> | Пинери, Канада |
| UWO (PS) 80-28 | Галл, <i>Prunus virginiana</i> | Пинери, Канада |
| UWO (PS) 82-232 | <i>Drosophila</i> sp. | Пинери, Канада |
| UWO (PS) 82-243 | <i>Drosophila</i> sp. | Пинери, Канада |
| UWO (PS) 82-326 | <i>Drosophila</i> sp. | Пинери, Канада |
| CBS 9942 | <i>Chloranthus japonicus</i> | Владивосток, Россия |
| CBS 9943 | <i>Actinida arguta</i> | Владивосток, Россия |
| ВКМ Y-2744 | <i>Kalopanax septemlobus</i> | Владивосток, Россия |
| ВКМ Y-2745 | <i>Schisandra chinensis</i> | Владивосток, Россия |

Примечание. Сокращенные названия коллекций: ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов (Пушино, Россия); CBS – The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Утрехт, Нидерланды); СЕСТ – Spanish Type Culture Collection, University of Valencia (Валенсия, Испания); NRRL – USDA-ARS Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, Перория, США; UCM – Украинская коллекция микроорганизмов, Институт микробиологии и вирусологии НАН, Киев, Украина; UWO (PS) – Culture collection of the Department of Biology, University of Western Ontario (Онтарио, Канада).

ченые штаммы *K. dobzhanskii* разделились на четкие группы, соответствующие трем географическим популяциям: североамериканской, европейской и дальневосточной. Обнаружена корреляция (GTG)₅-профилей европейских штаммов с источником их выделения: изоляты из насекомых имеют уникальные паттерны. Европейская популя-

ция также гетерогенна по нуклеотидным последовательностям митохондриального гена *COX2*. В пределах каждой из трех географических популяций штаммы имели практически идентичные 5.8S-ITS-последовательности, тогда как штаммы из разных популяций отличались по последовательностям этого участка рДНК. У штаммов, вы-

деленных в Северной Америке и Европе, замены обнаружены в ITS1, тогда как ITS2-последовательности у них были идентичными. Напротив, у дальневосточных штаммов замены выявлены также в ITS2-участке. Все обнаруженные нуклеотидные замены являются уникальными и коррелируют с географическим происхождением штаммов.

Следует отметить, что в отечественных и международных коллекциях имеется ограниченное количество дрожжей *K. dozhanskii*, поэтому выделение новых штаммов этого вида из природы в Дальневосточной Азии и других регионах мира позволит более полно изучить внутривидовую структуру этих дрожжей и обнаружить новые географические популяции.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование было поддержано совместным российско-тайваньским грантом РФФИ (№ 18-54-52002 МНТ_а) и MOST (№ 107-2923-B-007-001-MY3).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Наумова Е.С., Сухотина Н.Н., Наумов Г.И. Молекулярные маркеры, дифференцирующие молочные дрожжи *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* от их ближайших диких родственников – европейской популяции “krassilnikovii” // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 387–393.
- Naumova E.S., Sukhotina N.N., Naumov G.I. Molecular markers for differentiation between the closely related dairy yeast *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* and wild *Kluyveromyces lactis* strains from the European “krassilnikovii” population // Microbiology (Moscow). 2005. V. 74. P. 329–335.
- Наумова Е.С., Садыкова А.Ж., Михайлова Ю.В., Наумов Г.И. Полиморфизм лактозных генов молочных дрожжей *Kluyveromyces marxianus*, потенциальных пробиотических микроорганизмов // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 335–343.
- Naumova E.S., Sadykova A.Zh., Michailova Yu.V., Naumov G.I. Polymorphism of lactose genes in the dairy yeasts *Kluyveromyces marxianus*, potential probiotic microorganisms // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 363–369.
- Baleiras Couto M.M., Eijmsa B., Hofstra H., Huis in't Veld J.H., van der Vossen J.M. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 41–46.
- Belloch C., Barrio E., Uruburu F., Garcia M.D., Querol A. Characterization of four species of the genus *Kluyveromyces* by mitochondrial DNA restriction analysis // Syst. Appl. Microbiol. 1997. V. 20. P. 397–408.
- Belloch C., Querol A., Garcia M.D., Barrio E. Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene // Int. J. System. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 405–416.
- Belloch C., Fernandez-Espinar T., Querol A., Garcia M.D., Barrio E. An analysis of inter- and intraspecific genetic variabilities in the *Kluyveromyces marxianus* group of yeast species for the reconsideration of the *K. lactis* taxon // Yeast. 2002. V. 19. P. 257–268.
- Foncela G.G., Heizle E., Wittmann C., Gormbert A.K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 79. P. 339–354.
- James S.A., Collins M.D., Roberts I.N. Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulasporea* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1996. V. 46. P. 189–194.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. P. 1870–1874.
- Kurtzman C.P. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygotorulosporea* // FEMS Yeast Res. 2003. V. 4. P. 233–245.
- Kurtzman C.P., Robnett C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences // Antonie van Leeuwenhoek. 1998. V. 73. P. 331–371.
- Lachance M.-A. *Kluyveromyces* van der Walt (1971) // The Yeasts. A Taxonomic Study / Eds. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. Amsterdam: Elsevier, 2011. P. 471–482.
- Maccaferri S., Klinder A., Brigidi P., Cavina P., Costabile A. Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in CACO-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an *in vitro* colonic model system // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 956–964.
- Naumova E.S., Naumov G.I., Molina F.I. Genetic variation among European strains of *Saccharomyces paradoxus*: results from DNA fingerprinting // Syst. Appl. Microbiol. 2000. V. 23. P. 86–92.
- Naumova E.S., Naumov G.I., Michailova Yu.V., Martynenko N.N., Masneuf-Pomarède I. Genetic diversity study of the yeast *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* reveals introgressed subtelomeric *Saccharomyces cerevisiae* genes // Res. Microbiol. 2011. V. 162. P. 204–213.
- Romanin D.E., Llopis S., Genovés S., Martorell P., Ramón V.D., Garrote G.L., Rumbo M.I. Probiotic yeast *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 shows anti-inflammatory and anti-oxidative stress properties in *in vivo* models // Beneficial Microbes. 2016. V. 7. № 4. P. 83–93.
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W. Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 6241–6246.

Sidenberg D.G., Lachance M.-A. Electrophoretic isoenzyme variation in *Kluyveromyces* populations and revision of *Kluyveromyces marxianus* (Hansen) van der Walt. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1986. V. 36. P. 94–102.

Suzuki T., Hoshino T., Matsushika A. Draft genome sequence of *Kluyveromyces marxianus* strain DMB1, isolated from sugarcane bagasse hydrolysate // Genome Announc. 2014. V. 2. e00733–14.

Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // Comp. Appl. Biosci. 1994. V. 10. P. 569–570.

Vu D., Groenewald M., Szo'ke S., Cardinali G., Eberhardt U., Stielow B., de Vries M., Verkleij G.J., Crous P.W., Boekhout T., Robert V. DNA barcoding analysis of more than 9000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation // Stud. Mycol. 2016. V. 85. P. 91–105.

Molecular Genetic Polymorphism of the Yeast *Kluyveromyces dobzhanskii*

E. S. Naumova^{1,*}, Ch.-Fu Lee², and G. I. Naumov^{1,†}

¹State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, NRC “Kurchatov Institute”, Moscow, 117519 Russia

²Department of Applied Science, National Tsing Hua University of Education, Hsinchu, 30014 Taiwan

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Received March 3, 2021; revised March 10, 2021; accepted March 11, 2021

Abstract—Based on strains of various ecological and geographical origin, we studied intraspecific polymorphism of the wild yeast *Kluyveromyces dobzhanskii*, the closest relative of the cultured dairy yeasts *K. lactis* and *K. marxianus*. Using microsatellite typing, phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the ITS1/ITS2 internal transcribed spacers and of the mitochondrial gene *COX2*, we found the species *K. dobzhanskii* to be of complex composition, consisting of at least three geographical populations: North American (including the type culture CBS 2104), European, and Far Eastern. Strains of different geographic origin were characterized by unique nucleotide substitutions in the ITS1/ITS2 region and in the mitochondrial *COX2* gene. In European strains, a correlation was revealed between the (GTG)₅ profiles and the source of isolation. The strains isolated from insects in Spain had unique patterns.

Keywords: *Kluyveromyces dobzhanskii*, microsatellite marker (GTG)₅, phylogenetic analysis, internal transcribed spacers ITS1 and ITS2, *COX2* mitochondrial gene