

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ФИЛОГЕНИЯ И РЕКЛАССИФИКАЦИЯ *RHODOTORULA PINALIS*
КАК *FELLOZYMA PINALIS* COMB. NOV.

© 2022 г. А. В. Качалкин^{a, b, *}

^aМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^bИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, 142290 Россия

*e-mail: kachalkin_a@mail.ru

Поступила в редакцию 14.02.2022 г.

После доработки 04.03.2022 г.

Принята к публикации 05.03.2022 г.

Дана генетическая характеристика и проведен филогенетический анализ голотипа вида *Rhodotorula pinalis*, штамм ВКМ У-2963. Полученные данные для ITS региона и D1/D2 доменов LSU размещены в генбанке NCBI (OM666053). Выявлена конспецифичность подмосковных штаммов *Fellozyma* sp. КБП 3851 со сфагновых мхов и *Rh. pinalis* ВКМ У-2963 с хвойного опада. Полученные данные по филогении показали, что вид *Rh. pinalis* должен быть отнесен к роду *Fellozyma*. В данной работе публикуется новая комбинация *Fellozyma pinalis* comb. nov., зарегистрированная в базе MucosBank MB842988.

Ключевые слова: дрожжи, таксономия, *Rhodotorula*, *Fellozyma*, *Chysozymaceae*, *Pucciniomycotina*

DOI: 10.31857/S0026365622100081

В настоящее время насчитывается около 2000 видов дрожжей, которые относятся к аскомицетовым и базидиомицетовым одноклеточным или диморфным грибам (Boekhout et al., 2021a). Систематика дрожжевых грибов, впрочем, как и любой другой группы микроорганизмов, к настоящему времени прошла сложный путь преобразований со сменой основных критериев и подходов к таксономии, и ведущая роль в таксономических исследованиях теперь отводится молекулярному филогенетическому анализу (Boekhout et al., 2021b). В 2012 году внутренний транскрибируемый спейсер (ITS регион) рРНК был предложен в качестве универсального генетического маркера для грибов (Schoch et al., 2012). Однако еще ранее для многих типовых штаммов дрожжей были сделаны сиквенсы рибосомальных генов и проведены первые масштабные филогенетические исследования (Kurtzman, Robnett, 1998; Fell et al., 2000; Scorzetti et al., 2002). С этого же периода ведущие микробиологические журналы не принимали статьи с описаниями новых видов дрожжей без филогенетических данных по рибосомальным генам.

Текущие таксономические исследования многих групп мицелиальных грибов и дрожжей связаны с анализом генов рРНК (например, Liu et al., 2015a; Wang et al., 2015a; Kachalkin et al., 2019) и с мультигенным подходом для систематики высших таксонов (например, Liu et al., 2015b; Wang et al., 2015b; Li et al., 2020). Данные по ITS регионам широко используются для метабаркодинга гриб-

ного населения природных и антропогенных субстратов (например, Tedersoo et al., 2014; Kuznetsova et al., 2021). При метабаркодинге сравнение полученных данных с информацией о референсных штаммах не только дает представление о составе грибных группировок, но и помогают лучше понять разнообразие всего царства грибов, среди которого нам известно не более 5–10% видов (Boekhout et al., 2021a).

Однако ранее при исследовании многих групп дрожжей, по тем или иным причинам, основной упор был сделан на данные о нуклеотидной последовательности гена большой субъединицы (LSU) рРНК. Особенно это касается аскомицетовых дрожжей, для ряда описанных видов нуклеотидные последовательности ITS региона неизвестны (данные YeastIP, <http://genome.jouy.inra.fr/yeastip/>). Поэтому в настоящее время требуется дополнительная генетическая характеристика коллекционных штаммов. Например, такая характеристика была сделана для дрожжей из коллекции CBS (Vu et al., 2016). Отсутствие данных о хотя бы одном генетическом маркере в настоящее время делает невозможным ни таксономические исследования, ни современную генетическую характеристику сообществ с помощью метабаркодинга.

Среди дрожжей видом с отсутствующими данными о генетических маркерах является *Rhodotorula pinalis* (Голубев, 2010), описание которого было сделано на изолятах с хвойного опада *Pinus sylvestris*. Цель данного исследования – генетическая харак-

теристика и филогенетический анализ голотипа *Rh. pinalis* ВКМ Y-2963.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования был использован голотип *Rh. pinalis*, штамм ВКМ Y-2963. Выделение ДНК проводили с применением стеклянной дробы (диаметром 300–500 мкм) и лизирующего буфера (TrisBase 50 мМ, NaCl 250 мМ, ЭДТА 50 мМ, SDS 0.3%; pH 8), используя гомогенизатор TissueLyser LT (“Qiagen”, Германия) и инкубирование при температуре 65°C. Для амплификации региона гена рРНК, содержащего ITS регион и D1/D2 домены LSU, использовали праймеры ITS1f (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA) и LR5 (5'-TCC TGA GGG AAA CTT CG). Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США) с последующим анализом продуктов реакции на секвенаторе 3130xl Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”, США) в ЗАО “Евроген” (Москва). Для секвенирования были использованы праймеры ITS5 и LR5. Полученная в ходе генетического исследования нуклеотидная последовательность размещена в генбанке NCBI под номером OM666053.

Выполнен филогенетический анализ для сравнения нуклеотидных последовательностей генов рРНК, полученных после секвенирования, и данные для типовых штаммов по недавним ревизиям дрожжей подотдела *Pucciniomycotina* (Wang et al., 2015a, 2015b; Li et al., 2020). Филогенетический анализ (Maximum Likelihood) на основе данных нуклеотидных последовательностей региона ITS1-5.8S-ITS2 и D1/D2 доменов LSU проводился с использованием программы MEGA v.6 (Tamura et al., 2013). GTR модель с гамма-распределением и инвариантными сайтами (G + I) использована в качестве модели нуклеотидных замен. Множественное выравнивание последовательностей выполнено в программе MAFFT v.7 (Katoh et al., 2019).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования была получена нуклеотидная последовательность размером 1388 п.н. для штамма ВКМ Y-2963, содержащая ITS регион и D1/D2 домены LSU рДНК. Используя эти данные, был проведен поиск (BLASTn) через генбанк NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) и базу данных MycoID (www.mycobank.org) для обнаружения схожих нуклеотидных последовательностей. Результаты поиска по генбанку NCBI показали сходство 100% с нуклеотидной последовательностью LSU региона штамма *Fellozyma* sp. КБП 3851 (= (/gh) КБП Y-6581, CBS 11782, DSM 108826), выделенным в ходе исследования дрожжевого населения сфагновых мхов в Московской области

(Качалкин и соавт., 2008). Сравнение ITS регионов штаммов КБП 3851 и ВКМ Y-2963 показало различие в 1 п.н. (сходство 99.8%). Сходство 99.8–100% ITS региона и D1/D2 доменов рДНК соответствует уровню внутривидовой варируемости для дрожжей (Vu et al., 2016). Проведенный поиск в базе данных MycoID показал отсутствие культур со сходством 99–100% по ITS региону со штаммом ВКМ Y-2963. Таким образом, полученные нами результаты указывают, что для типового штамма (голотипа) *Rh. pinalis* ВКМ Y-2963 в генбанке NCBI и базе MycoID отсутствуют данные о нуклеотидных последовательностях ITS региона и/или D1/D2 доменов LSU, но имеется информация о другом представителе этого вида дрожжей – *Fellozyma* sp. КБП 3851.

В качестве генетической характеристики вида *Rh. pinalis* при описании было указано различие по рДНК с близкородственным видом *Sporobolomyces inositolophilus* (нынешнее название *Fellozyma inositolophila*) – четыре нуклеотида в D1/D2 доменах и более 20 нуклеотидов в ITS регионах (Голубев, 2010). Полученные нами результаты показали, что различие по рДНК с типовым штаммом *F. inositolophila* CBS 7310 составляет шесть нуклеотидных замен и шесть делеций в D1/D2 доменах по данным секвенирования 2016 г. (NG_066180) и четыре нуклеотида – по данным 1999 г. (AF189987). Различие между сиквенсами D1/D2 доменов за разные годы для штамма *F. inositolophila* CBS 7310 составляет 0.80% (5 делеций). Используя данные ITS региона, различия *Rh. pinalis* ВКМ Y-2963 и *F. inositolophila* CBS 7310 составляют 18 замен и 18 делеций по данным секвенирования 2001 г. (AF444559) и 18 замен и 19 делеций – по данным 2016 г. (KY103411). Различие между ITS сиквенсами за разные годы для штамма *F. inositolophila* CBS 7310 составляет 0.16% (одна делеция). Таким образом, приведенная генетическая характеристика в описании вида *Rh. pinalis* соответствует полученным нами данным для голотипа ВКМ Y-2963. В то же время ситуация с достаточно сильно различающимися сиквенсами D1/D2 доменов для типового штамма *F. inositolophila* CBS 7310 требует прояснения в будущем. Несмотря на это, полученные результаты показывают, что вид *Rh. pinalis*, действительно, является близкородственным *F. inositolophila*. Различие между штаммами CBS 7310 и ВКМ Y-2963 соответствует межвидовому уровню по данным нуклеотидных последовательностей ITS региона и D1/D2 доменов (Vu et al., 2016).

Монотиповой род *Fellozyma* был выделен в ходе ревизии полифилетических родов базидиомицетовых дрожжей подотдела *Pucciniomycotina*: *Bensingtonia*, *Bullera*, *Rhodosporeidium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* и *Sporobolomyces* и др. (Wang et al., 2015a). С внедрением принципа “Один гриб = одно имя” (McNeill et al., 2012) подобные полифилетические роды подвергаются таксономическим ревизиям.

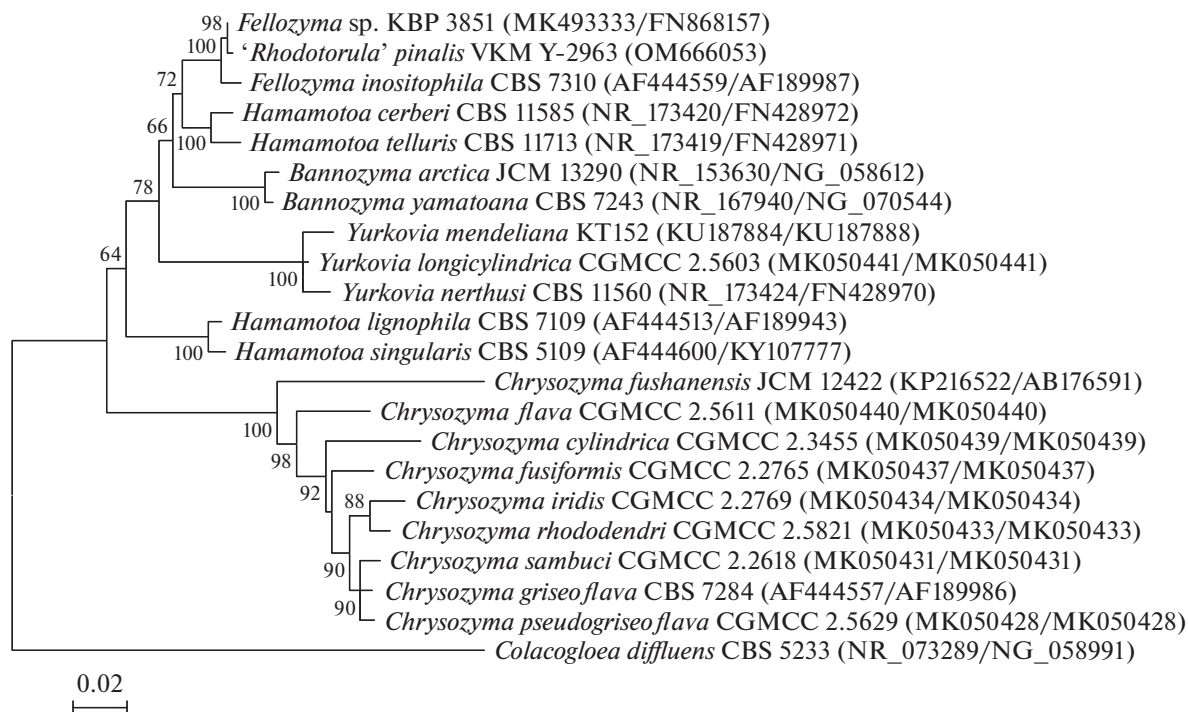


Рис. 1. Филогенетический анализ для представителей семейства *Chrysozymaceae* на основе нуклеотидных последовательностей ITS региона и D1/D2 доменов рДНК. Бутстрэп более 50% (отмечен на древе) получен для 1000 альтернативных построений. В скобках указаны номера нуклеотидных последовательностей для типовых штаммов.

Такие таксономические изменения базируются на молекулярном филогенетическом анализе (например, Liu et al., 2015a; Wang et al., 2015a), но если для того или иного описанного вида дрожжей отсутствуют данные в виде сиквенсов в публично доступном генбанке NCBI, то вид просто не включается в ревизию. Именно такая ситуация и произошла с *Rh. pinalis*, который должен был бы быть переописан вместе с видом *Sp. inositolophilus* как род *Fellozyma* (Wang et al., 2015a).

Проведенный филогенетический анализ для представителей семейства *Chrysozymaceae*, близких родственных к *Fellozyma*, на основании нуклеотидных последовательностей ITS региона и D1/D2 доменов LSU рДНК показал достоверную поддержку клада (бутстрэп 100%), который объединяет штаммы *F. inositolophila* CBS 7310 и *Rh. pinalis* VKM Y-2963, а также штамм *Fellozyma* sp. KBП 3851 (рис. 1). Выявленные вариации в сиквенсах *F. inositolophila* CBS 7310 за разные периоды располагаются на начальном участке прочтения нуклеотидных последовательностей, поэтому они не учитывались при филогенетическом анализе. Полученные нами данные по филогении подтверждают, что виды *F. inositolophila* и *Rh. pinalis* должны быть отнесены к одному роду. В данной работе публикуется новая комбинация для рода *Fellozyma*.

Новая комбинация для рода *Fellozyma* Q.M. Wang, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout.

Fellozyma pinalis (Golubev) Kachalkin, comb. nov. MycoBank MB842988.

Базиниум: *Rhodotorula pinalis* Golubev, Микология и Фитопатология 44(4):310. 2010.

Голотип: VKM Y-2963 (хранится в метаболически неактивном состоянии).

New combination for *Fellozyma* Q.M. Wang, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout.

Fellozyma pinalis (Golubev) Kachalkin, comb. nov. MycoBank MB842988.

Basionym: *Rhodotorula pinalis* Golubev, Mikologiya i Fitopatologiya 44(4):310. 2010.

Holotype: VKM Y-2963 (preserved in a metabolically inactive state).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1051.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Голубев В.И. Новый вид *Rhodotorula*, ассимилирующий миоинозит // Микология и фитопатология. 2010. Т. 44. С. 310–313.
- Golubev V.I. A new myo-inositol-positive species of the genus *Rhodotorula* // Mikologiya i Fitopatologiya. 2010. V. 44. P. 310–314.
- Качалкин А.В., Глушакова А.М., Юрков А.М., Чернов И.Ю. Особенности дрожжевых группировок в филлосфере сфагновых мхов // Микробиология. 2008. Т. 77. С. 533–541.
- Kachalkin A.V., Glushakova A.M., Yurkov A.M., Chernov I.Yu. Characterization of yeast groupings in the phyllosphere of sphagnum mosses // Microbiology. 2008. V. 77. P. 474–481.
- Lücking R., Aime M.C., Robbertse B., Miller A.N., Aoki T., Ariyawansa H.A., Cardinali G., Crous P.W., Druzhinina I.S., Geiser D.M., Hawksworth D.L., Hyde K.D., Irinyi L., Jeewon R., Johnston P.R., Kirk P.M., Malosso E., May T.W., Meyer W., Nilsson H.R., Öpik M., Robert V., Stadler M., Thines M., Vu D., Yurkov A.M., Zhang N., Schoch C.L. Fungal taxonomy and sequence-based nomenclature // Nat. Microbiol. 2021. V. 6. P. 540–548.
- Boekhout T., Amend A.S., El Baidouri F., Gabaldón T., Geml J., Mittelbach M., Robert V., Tan C.S., Turchetti B., Vu D., Wang Q.-M., Yurkov A. Trends in yeast diversity discovery // Fungal Diversity. 2021a. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00494-6>
- Boekhout T., Aime M.C., Begerow D., Gabaldón T., Heitman J., Kemler M., Khayhan K., Lachance M.-A., Louis E.J., Sun S., Vu D., Yurkov A. The evolving species concepts used for yeasts: from phenotypes and genomes to speciation networks // Fungal Diversity. 2021b. V. 109. P. 27–55.
- Fell J.W., Boekhout T., Fonseca A., Scorzetti G., Statzell-Tallman A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 1351–1371.
- Katoh K., Rozewicki J., Yamada K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization // Brief. Bioinform. 2019. V. 20. P. 1160–1166.
- 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.
- Kuznetsova T.A., Veverskii M.V., Khayrullin D.R., Stepankov A.A., Maximova I.A., Kachalkin A.V., Ushakova N.A. Dramatic effect of black soldier fly larvae on fungal community in a compost // J. Sci. Food Agric. 2021. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11601>
- Li A.H., Yuan F.X., Groenewald M., Bensch K., Yurkov A.M., Li K., Han P.J., Guo L.D., Aime M.C., Sampaio J.P., Jindamorakot S., Turchetti B., Inacio J., Fungsin B., Wang Q.-M., Bai F.-Y. Diversity and phylogeny of basidiomycetous yeasts from plant leaves and soil: Proposal of two new orders, three new families, eight new genera and one hundred and seven new species // Stud. Mycol. 2020. V. 96. P. 17–140.
- Liu X.Z., Wang Q.-M., Göker M., Groenewald M., Kachalkin A.V., Lumbsch H.T., Millanes A.M., Wedin M., Yurkov A.M., Boekhout T., Bai F.-Y. Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomycetes* // Stud. Mycol. 2015a. V. 81. P. 85–147.
- Liu X.Z., Wang Q.-M., Theelen B., Groenewald M., Bai F.-Y., Boekhout T. Phylogeny of tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses // Stud. Mycol. 2015b. V. 81. P. 1–26.
- McNeill J., Barrie F., Buck W., Demoulin V., Greuter W., Hawksworth D. et al. International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants (Melbourne Code). Königstein: Koeltz Scientific Books, 2012. 208 p.
- 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.
- Scorzetti G., Fell J.W., Fonseca A., Statzell-Tallman A. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions // FEMS Yeast Res. 2002. V. 2. P. 495–517.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. P. 2725–2729.
- Tedersoo L., Bahram M., Pölme S., Kõljalg U., Yorou N.S., Wijesundera R., Villarreal Ruiz L., Vasco-Palacios A.M., Thu P.Q., Suija A., Smith M.E., Sharp C., Saluveer E., Saitta A., Rosas M., Riit T., Ratkowsky D., Pritsch K., Pöldmaa K., Piepenbring M., Phosri C., Peterson M., Parts K., Pärtel K., Otsing E., Nouhra E., Njouonkou A.L., Nilsson R.H., Morgado L.N., Mayor J., May T.W., Majuakim L., Lodge D.J., Lee S.S., Larsson K.H., Kohout P., Hosaka K., Hiiesalu I., Henkel T.W., Harend H., Guo L.D., Greslebin A., Grelet G., Geml J., Gates G., Dunstan W., Dunk C., Drenkhan R., Dearnaley J., De Kesel A., Dang T., Chen X., Buegger F., Brearley F.Q., Bonito G., Anslan S., Abell S., Abarenkov K. Fungal biogeography. Global diversity and geography of soil fungi // Science. 2014. V. 346. Art. 1256688.
- Vu D., Groenewald M., Szöke 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.
- Wang Q.-M., Groenewald M., Takashima M., Theelen B., Han P.J., Liu X.Z., Boekhout T., Bai F.-Y. Phylogeny of yeasts and related filamentous fungi within *Pucciniomycotina* determined from multigene sequence analyses // Stud. Mycol. 2015b. V. 81. P. 27–53.
- Wang Q.-M., Yurkov A.M., Göker M., Lumbsch H.T., Leavitt S.D., Groenewald M., Theelen B., Liu X.Z., Boekhout T., Bai F.-Y. Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within *Pucciniomycotina* // Stud. Mycol. 2015a. V. 81. P. 149–189.

Phylogeny of *Rhodotorula pinalis* and Its Reclassification as *Fellozyma pinalis* comb. nov.

A. V. Kachalkin^{1, 2, *}

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

²Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Science, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: kachalkin_a@mail.ru

Received February 14, 2022; revised March 4, 2022; accepted March 5, 2022

Abstract—The type strain *Rhodotorula pinalis* VKM Y-2963 has been characterized genetically and phylogenetically. The rDNA sequences obtained for the ITS region and D1/D2 domains of LSU have been deposited to NCBI GenBank (OM666053). Strains from the Moscow region, *Fellozyma* sp. KBP 3851 from *Sphagnum* mosses and *Rh. pinalis* VKM Y-2963 from dead conifer needles, were found to be conspecific. The results of phylogenetic analysis suggested that the species *Rh. pinalis* should be reassigned to the genus *Fellozyma*. The new combination, *Fellozyma pinalis* comb. nov., is proposed, MycoBank MB842988.

Keywords: yeasts, taxonomy, *Rhodotorula*, *Fellozyma*, *Chrysozymaceae*, *Pucciniomycotina*