

ВНУТРИВИДОВОЙ ПОЛИМОРФИЗМ ДРОЖЖЕЙ  
*KLUYVEROMYCES LACTIS*: ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОПУЛЯЦИИ© 2022 г. Л. В. Лютова<sup>а, б</sup>, Г. И. Наумов<sup>а</sup>, А. В. Шнырева<sup>б</sup>, Е. С. Наумова<sup>а, \*</sup><sup>а</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”,  
Курчатовский комплекс генетических исследований (ГосНИИгенетика), Москва, 123098 Россия<sup>б</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
кафедра микологии и альгологии, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: lena\_naumova@yahoo.com

Поступила в редакцию 10.03.2022 г.

После доработки 25.03.2022 г.

Принята к публикации 26.03.2022 г.

Согласно современной классификации дрожжей, вид *Kluyveromyces lactis* включает две таксономические разновидности: культурные молочные дрожжи *K. lactis* var. *lactis* и не сбраживающие лактозу природные штаммы *K. lactis* var. *drosophilorum*. Основанное только на фенотипических и экологических критериях разделение на разновидности является достаточно условным и не отражает существующей гетерогенности вида *K. lactis*. С помощью различных молекулярных методов и гибридологического анализа мы изучили генетическое родство 35 штаммов *K. lactis*, выделенных из молочных продуктов и природных источников в разных регионах мира. Сбраживающие лактозу дрожжи *K. lactis*, включая молочные штаммы, клинические и почвенные изоляты, имели идентичные молекулярные кариотипы, не отличались по нуклеотидным последовательностям ряда молекулярных маркеров и образовывали фертильные гибриды: 84–99% выживаемости аскоспор. С другой стороны, не сбраживающие лактозу дрожжи разделились на три генетически изолированные популяции: “krassilnikovii”, “drosophilorum” и “phaseolosporus”, которые отличаются по молекулярным кариотипам, имеют уникальные SNP-замены в гене *ACT1* и образуют полустерильные гибриды: 6–34% выживаемости аскоспор. Несмотря на значительный полиморфизм индивидуальных размеров хромосомных полос, дрожжи var. *lactis*, “krassilnikovii”, “drosophilorum” и “phaseolosporus”, по-видимому, имеют одинаковое гаплоидное число хромосом, равное шести. Наибольший диапазон размеров хромосомных полос отмечен у штаммов “krassilnikovii” (1000–2900 т.п.н.), а наименьший – у “drosophilorum” (1600–2200 т.п.н.). Обращает на себя внимание биогеография дрожжей *K. lactis*. Сбраживающие лактозу штаммы *K. lactis* var. *lactis* выделяются в различных регионах мира, дрожжи “drosophilorum” и “phaseolosporus” характерны только для Северной Америки, тогда как популяция “krassilnikovii” представлена европейскими и среднеазиатскими изолятами. Установлено, что на основании нуклеотидных последовательностей гена *ACT1* можно достоверно дифференцировать все четыре генетические популяции дрожжей *K. lactis*.

**Ключевые слова:** дрожжи *Kluyveromyces lactis*, генетические популяции, филогенетический и гибридологический анализы, молекулярное кариотипирование, ядерный ген *ACT1*

DOI: 10.31857/S002636562230019X

Дрожжи *Kluyveromyces lactis* – второй, после *Saccharomyces cerevisiae*, объект фундаментальных и прикладных исследований. Штаммы этих дрожжей выделяются из различных молочных продуктов (молоко, кефир, простокваша, ряженка, творог и др.) и природных источников (сокотечение и кора широколиственных деревьев, почва, насекомые и др.) в разных регионах мира. Несмотря на большое научное и прикладное значение дрожжей *K. lactis*, их систематика остается дискуссионной.

На основании экологических и физиологических критериев вид *K. lactis* был разделен на две

разновидности: сбраживающие лактозу культурные дрожжи *K. lactis* var. *lactis* и не утилизирующие лактозу природные изоляты *K. lactis* var. *drosophilorum* (Sidenberg, Lachance, 1983, 1986). К синонимам последней разновидности были отнесены таксономические виды *K. phaseolosporus* и *K. vanudenii*, принятые в определители дрожжей 1970 г. (van der Walt, 1970). В список синонимов *K. lactis* var. *drosophilorum* также попали европейские дрожжи *Zygodospora krassilnikovii*, впервые описанные Кудрявцевым на изолятах из сокотечений дуба в Калуге (Kudrjawzew, 1960). Следует отметить, что разделение вида *K. lactis* на две физиологические

разновидности не отражает существующей гетерогенности *K. lactis* var. *drosophilorum*, продемонстрированной с помощью различных молекулярных методов: ПДРФ-анализа мтДНК, RAPD-ПЦР, секвенирования 5.8S-ITS-района рДНК и молекулярного кариотипирования (Ragnini, Fukuhara, 1988; Sor, Fukuhara, 1989; Molnar et al., 1996; Belloch et al., 1997, 1998a, 1998b, 2000, 2002; Naumov, Naumova, 2002). Показано, что штаммы *K. lactis* var. *lactis* имеют одинаковые мтДНК и RAPD-профили, идентичные ITS-последовательности и практически не отличаются по молекулярным кариотипам. Тогда как не утилизирующие лактозу дрожжи *K. lactis* var. *drosophilorum* разделились на четыре группы: *K. drosophilorum*, *K. phaseolosporus*, *K. vanudenii* и *K. lactis* var. *krassilnikovii* (*Zygozopora krassilnikovii*).

Молекулярные данные хорошо согласуются с результатами гибридологического анализа (Naumov, Naumova, 2002). Показано, что типовые культуры *K. drosophilorum*, *K. phaseolosporus* и *Zygozopora krassilnikovii* частично-генетически изолированы: их гибриды стерильны или полустерильны с выживаемостью аскоспор 0–34%. В то же время, *Z. krassilnikovii* образовывали фертильные гибриды с южноафриканскими дрожжами *K. vanudenii*: 72–90% выживаемости аскоспор. Принимая во внимание географическую изоляцию, а также литературные данные о дивергенции их молекулярных кариотипов и мтДНК-профилей (Sor, Fukuhara, 1989; Belloch et al., 1997, 1998a, 2002), было предложено рассматривать дрожжи *K. vanudenii* и *Zygozopora krassilnikovii* в качестве самостоятельных таксонов: видов или разновидностей (Belloch et al., 2002; Naumov, Naumova, 2002). На основании гибридологического анализа и молекулярного кариотипирования, а также литературных данных, была проведена таксономическая ревизия вида *K. lactis* и предложено 5 разновидностей: var. *lactis* (Лас<sup>+</sup>) и не утилизирующие лактозу var. *drosophilorum* (Северная Америка), var. *phaseolospora* (Северная Америка), var. *krassilnikovii* (Европа), var. *vanudenii* (Южная Африка) (Naumov, Naumova, 2002).

Однако предложенная ревизия не была принята в последующих монографиях, посвященных систематике дрожжей *Kluyveromyces*, и вид *K. lactis*, по-прежнему, был представлен двумя разновидностями var. *lactis* и var. *drosophilorum* (Lachance, 2007, 2011). В качестве объяснения было отмечено, что условное деление на две разновидности было оставлено для сохранения преемственности в литературе и в связи с неоднозначной дифференциацией не усваивающих лактозу дрожжей *K. lactis* на разновидности var. *drosophilorum*, var. *phaseolospora*, var. *krassilnikovii* и var. *vanudenii* (Lachance, 2007). На основании ПДРФ-анализа межгенного спейсера IGS2 нами ранее было идентифицировано еще четыре генетические популяции не утили-

зирующих лактозу дрожжей *K. lactis*: три в Северной Америке (“водная”, “pseudovanudenii” и “новая”) и одна на Дальнем Востоке (“восточная”) (Naumova et al., 2004).

Целью настоящего исследования является изучение генетического внутривидового полиморфизма дрожжей *K. lactis*, определение таксономического статуса дивергентных природных популяций и обнаружение молекулярных маркеров для их достоверной дифференциации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объекты исследования.** Используемые в работе штаммы и их происхождение представлены в табл. 1. Дрожжи культивировали на полной среде YPD (г/л): бакто-агар (“Difco”, США) – 20; глюкоза (“Merck”, Германия) – 20; дрожжевой экстракт (“Difco”) – 10; бакто-пептон (“Difco”) – 20. Споруляцию индуцировали на агаризованной голодной среде с 3%-ной мальтозой (г/л): бакто-агар (“Difco”, США) – 20; мальтоза (“Sigma”, США) – 30. Ферментационная среда YP (г/л): лактоза (“Serva”, Германия) – 20; дрожжевой экстракт (“Difco”) – 10; бакто-пептон (“Difco”) – 20. Способность сбрасывать лактозу определяли по выделению углекислого газа в жидкой среде YP в пробирках с поплавками. На всех средах дрожжи культивировали при 28°C.

**Полимеразную цепную реакцию** осуществляли на ДНК-амплификаторе “Bio-Rad” (США). Дрожжевую ДНК выделяли по протоколу, разработанному Løoke et al. (2011). Для амплификации 5.8S-ITS-фрагмента, включающего ген 5.8S РНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1/ITS2, использовали праймеры ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') и ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATTGC-3') (White et al., 1990). Гены *ACT1* и *EF-1α* (фактор элонгации трансляции) амплифицировали с помощью пар праймеров KL1 (5'-GCCGGTGACGACGCTCCAAGAGCCG-3'), KL5R (5'-GTGAACGATGGATGGACCAGATTCGTCG-3') и EF2F (5'-GGTAAGGGTTCTTTCAAGTACGCTTGGG-3'), EF2R (5'-CGTTCTTGGAGTCAACCACAGACGTTACCTC-3'). Дизайн олигонуклеотидных праймеров для амплификации и секвенирования генов *ACT1* и *EF-1α* осуществляли онлайн на сайте <https://www.yeastgenome.org>. ПЦР проводили в 30 мкл буфера, содержащего 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1 мМ каждого дНТФ, 50 пмоль каждого праймера, 2.5 единицы *Taq*-полимеразы (“Heli-con”, 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× TBE буфере (45 мМ Трис, 10 мМ

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

Штамм		Источник и место выделения	Популяция	
ВКМ	другие коллекции			
<i>var. lactis</i>				
Y-868 (Т)	CBS 683	Мягкий сыр, Великобритания	“lactis”	
	CBS 1797	Мокрота, Норвегия	“lactis”	
	CBS 5618	Мокрота, Норвегия	“lactis”	
	NRRL Y-1140	Сливки, США	“lactis”	
	NRRL Y-1118	Сливки, США	“lactis”	
	SM 48.7	Сыр Камамбер, Франция	“lactis”	
	ВКПМ Y-3737	Почва, Москва, Россия	“lactis”	
	Y-762	CBS 141	Сливки, США	“lactis”
	Y-869		Кислое молоко, Кольский п-ов, Россия	“lactis”
	Y-870		Чал (кисломолочный напиток из верблюжьего молока), Туркмения	“lactis”
Y-1186		Молоко, Киев, Украина	“lactis”	
Y-1527	CBS 4574	Мокрота, Испания	“lactis”	
Y-1333		Кислое молоко, Ставропольский край, Россия	“lactis”	
Y-1339		Сметана, Санкт-Петербург, Россия	“lactis”	
Y-1343		Молоко, Гомельская обл., Беларусь	“lactis”	
Y-1868		Чал (кисломолочный напиток из верблюжьего молока), Туркмения	“lactis”	
<i>var. drosophilarum</i>				
Y-1302 (Т)	CBS 2105	<i>Drosophila azteca</i> , Калифорния, США	“drosophilarum”	
	UWOPS 79-169	<i>Prunus virginiana</i> , Онтарио, Канада	“drosophilarum”	
	UWOPS 79-261	<i>Prunus virginiana</i> , Онтарио, Канада	“drosophilarum”	
	UWOPS 82-233	<i>Drosophila</i> sp., Онтарио, Канада	“drosophilarum”	
	UWOPS 80-45	<i>Prunus virginiana</i> , Онтарио, Канада	“новая”	
Y-1296	UWOPS 85-256.1	Дуб, Аризона, США	“новая”	
	CBS 2103	<i>Drosophila</i> sp., Калифорния, США	“phaseolosporus”	
	UCDFST 51-272	<i>Drosophila</i> sp., Калифорния, США	“phaseolosporus”	
	UCDFST 61-200	<i>Drosophila</i> sp., Калифорния, США	“phaseolosporus”	
Y-831	CBS 8883	Сокотечение дуба, Калуга, Россия	“krassilnikovii”	
Y-834	CBS 9056	Сокотечение дуба, Калуга, Россия	“krassilnikovii”	
	CBS 9057	Сокотечение дуба, Эстония	“krassilnikovii”	
	CBS 9058	Сокотечение дуба, Воронеж, Россия	“krassilnikovii”	
	СЕСТ 1122	Буровая мука, Испания	“krassilnikovii”	
	CBS 2877	Кишечник коровы, Португалия	“krassilnikovii”	
	CBS 2896	Сокотечение дуба, Калуга, Россия	“krassilnikovii”	
	Y-1535	CBS 4372	Винный подвал, ЮАР	“vanudenii”
	UCM Y-1891	Кишечник осы <i>Dolichovespula saxonica</i> , Таджикистан	“krassilnikovii”	
	UCM Y-1892	Кишечник осы <i>Dolichovespula saxonica</i> , Таджикистан	“krassilnikovii”	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>				
Y-876	CBS 712 (Т)	Неизвестно		

Примечание. Сокращенные названия коллекций: ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов, Пушкино, Москва; ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, Москва, Россия; CBS – The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Утрехт, Нидерланды; SM – J.P. Schmidt, Institut National Agronomique, Париж-Гриньон, Франция; NRRL – USDA-ARS Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, Пеория, США; UCM – Украинская коллекция микроорганизмов, Институт микробиологии и вирусологии НАН, Киев, Украина; UCDFST – Phaff Yeast Collection, University of California, Дэвис, США; UWOPS – Culture collection of the Department of Biology, University of Western Ontario, Лондон, Онтарио, Канада; СЕСТ – Spanish Type Culture Collection, University of Valencia, Валенсия, Испания. Соответствие штаммов различных коллекций: NRRL Y-1140 = CBS 2359, NRRL Y-1118 = CBS 6315. Т – типовая культура.

ЭДТА, 45 мМ борная кислота; рН 8.0) в течение 1–1.5 ч. Гель 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”, США).

Для амплификации межгенного спейсера 2 (IGS2) рДНК использовали праймеры NTS2 (5'-AACGGTGCTTTCTGGTAG-3') и ETS1 (5'-TGTCTTCAACTGCTTT-3') (Nguyen et al., 2000). ПЦР (25 циклов) осуществляли в следующем режиме: денатурация ДНК при 94°C, 1 мин; отжиг праймеров при 48°C, 30 с; синтез ДНК при 72°C, 60 с. Анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ) осуществляли с помощью эндонуклеазы *AluI* (“Fermentas”, Литва). Разделение фрагментов рестрикции проводили в 2.5%-ном агарозном геле при 50–55 В в 0.5× ТВЕ буфере в течение 4 ч. Гель окрашивали бромистым этидием в течение 2–3 ч, затем промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция).

**Секвенирование.** Амплифицированные фрагменты домена 5.8S-ITS района рДНК, генов *ACT1* и *EF-1α* элюировали из геля с помощью набора Cleanup Mini (“Евроген”, Москва) согласно протоколу фирмы изготовителя. Нуклеотидные последовательности 5.8S-ITS, генов *ACT1* и *EF-1α*, были определены по двум цепям с помощью пар праймеров ITS1/ITS4, KL1/KL5R и EF2F/EF2R соответственно 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. Множественные выравнивания изученных нуклеотидных последовательностей проводили, используя программу BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Филогенетические деревья строили методом объединения соседей (Neighbor-Joining) в программе MEGA 7 (Kumar et al., 2016). В качестве внешней группы использовали типовую культуру дрожжей *Kluyveromyces marxianus* CBS 712. Индексы бутстрепа, определяющие статистическую достоверность выделения групп, определяли для 1000 псевдореплик.

**Молекулярное кариотипирование.** Условия приготовления препаратов хромосомной ДНК описаны ранее (Наумова и соавт., 2005). Электрофоретическое разделение хромосомных ДНК проводили на аппарате CHEF-DR III фирмы “Bio-Rad”

(США). Для оптимального разделения хромосомных полос дрожжей использовали два различных режима кариотипирования: 1) 175 В, в течение 8 ч при времени переключения полей 40–120 с; 130 В, в течение 24 ч при времени переключения полей 120–360 с; 100 В, в течение 8 ч при времени переключения полей 360–1200 с. Использовали 0.8%-ю агарозу; 2) 65 В, в течение 50 ч при времени переключения полей 1600–2000 с; 70 В, в течение 48 ч при времени переключения полей 800–1600 с; 75 В, в течение 22 ч при времени переключения полей 120–600 с. Использовали 1.2%-ю агарозу.

В качестве буфера применяли 0.5× ТВЕ (45 мМ Трис, 45 мМ борная кислота, 10 мМ ЭДТА; рН 8.2), охлажденный до 14°C. В качестве кариотипических стандартов использовали коммерческие препараты ДНК штаммов *S. cerevisiae* YNN 295 (=ATCC 20358) и *Wickerhamomyces canadensis* (син. *Hansenula wingei*) YB-4662-VIA (=ATCC 28162) (“Bio-Rad”, США), имеющие известные размеры и порядок хромосом. После электрофореза гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция).

**Гибридологический анализ.** Высокофертильные моноспоровые культуры изучаемых штаммов маркировали ауксотрофными мутациями с помощью УФ-облучения. Спонтанные ауксотрофные мутации *ura* отбирали на селективной среде, содержащей 5'-фтороротовую кислоту (5-FOA) (Boeke, 1984).

Суточные культуры штаммов с комплементарными селективными ауксотрофными маркерами наносили “крест-накрест” бархатным репликатором с полной среды на голодную среду с мальтозой, а через 1 сут инкубирования дрожжи вновь переносили бархатным репликатором на минимальную среду (г/л): азотная основа без аминокислот (“Difco”, США) – 6.7, бакто-агар (“Difco”) – 20, глюкоза (“Реахим”, Россия) – 20. Рост гибридных колоний регистрировали через 2–3 сут на пересечении штрихов. Гибриды клонировали на минимальной среде для гарантии освобождения от ауксотрофных родительских культур. Выросшие на минимальной среде клоны гибридов пересевали штрихами на YPD среду и через 1 сут переносили на мальтозную среду для спорообразования. Изоляция спор гибридов проводили с помощью микроманипулятора. Оболочки асков разрушали ферментным препаратом из желудка виноградной улитки *Helix pomatia*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

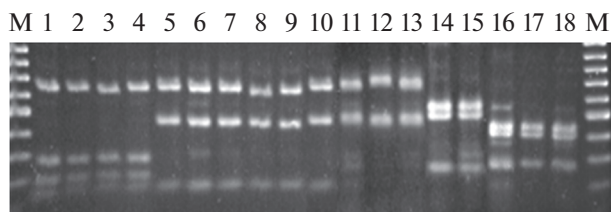
Объектом исследования служили 35 штаммов *Kluyveromyces lactis*, выделенных из различных мо-

лочных продуктов и природных источников в разных регионах мира: Европе (Россия, Украина, Беларусь, Эстония, Великобритания, Франция, Норвегия, Испания, Португалия), Средней Азии (Туркмения, Таджикистан), США, Канада и ЮАР (табл. 1).

**ПДРФ-анализ IGS2 района рДНК.** По сходству *AluI*-профилей изученные штаммы были разделены на пять групп (рис. 1). Идентичные паттерны имели штаммы var. *lactis* и типовая культура *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 (дорожки 1–3 и 4). Во вторую группу вошли европейские природные изоляты популяции “krassilnikovii”, а также выделенные в Таджикистане штаммы UCM Y-1891 и UCM Y-1892 (рис. 1, дорожки 5–8 и 9, 10 соответственно). Остальные три группы образованы штаммами североамериканских популяций: “*drosophilum*”, “новая” и “*phaseolosporus*” (рис. 1, дорожки 11–13, 14, 15 и 16–18). Дальнейшее изучение внутривидового молекулярного полиморфизма дрожжей *K. lactis* проводили с помощью мультигенного филогенетического анализа и молекулярного карiotипирования.

**Мультигенный филогенетический анализ.** Для установления филогенетического родства 35 изученных штаммов *K. lactis* мы провели сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей 5.8S-ITS-фрагмента рДНК, генов *EF-1α* и *ACT1*. В анализ были включены типовые культуры *K. lactis* var. *lactis* CBS 683 и *K. lactis* var. *drosophilum* CBS 2105, а также штамм, выделенный из молока, NRRL Y-1140, у которого определена полная нуклеотидная последовательность генома.

Мы провели секвенирование 5.8S-ITS-фрагмента у 11 штаммов *K. lactis* var. *lactis* (SM 48.7, CBS 1797, ВКПМ Y-3737, NRRL Y-1118, ВКМ Y-869, ВКМ Y-870, ВКМ Y-1186, ВКМ Y-1333, ВКМ Y-1339, ВКМ Y-1343, ВКМ Y-1868) и трех штаммов *K. lactis* var. *drosophilum* (CBS 2877, UCM Y-1891 и UCM Y-1892). ITS-последовательности остальных изученных штаммов были взяты из компьютерной базы данных GenBank. На основании сходства нуклеотидных последовательностей изученные штаммы разделились на две группы. В первую группу вошли 26 штаммов, включая 16 штаммов var. *lactis*, 7 штаммов европейской популяции “krassilnikovii”, среднеазиатские изоляты UCM Y-1891 и UCM Y-1892, а также типовая культура *K. vanudenii* ВКМ Y-1535. ITS-последовательности указанных штаммов были идентичны или отличались 1–4 нуклеотидными заменами. Наибольшее количество замен имел штамм var. *lactis* ВКМ Y-870, выделенный из чала в Туркмении. Вторая группа образована 9 североамериканскими штаммами популяций “*drosophilum*”, “*phaseolosporus*” и “новая”. У всех штаммов этой группы имеется характерная транзигия С → Т в 69 позиции (согласно нумерации



**Рис. 1.** ПДРФ-анализ амплифицированных фрагментов межгенного спейсера IGS2 рДНК штаммов *Kluyveromyces lactis* с помощью эндонуклеазы *AluI*. *K. lactis* var. *lactis*: 1 – ВКМ Y-868 (Т), 2 – NRRL Y-1140, 3 – ВКПМ Y-3737; “*vanudenii*”: 4 – ВКМ Y-1535 (Т); “krassilnikovii”: 5 – ВКМ Y-831 (Т), 6 – ВКМ Y-834, 7 – СЕСТ 1122, 8 – CBS 9058; “среднеазиатская”: 9 – UCM Y-1891, 10 – UCM Y-1892; *K. lactis* var. *drosophilum*: 11 – ВКМ Y-1302 (Т), 12 – UWO(PS) 79-261, 13 – UWO(PS) 82-233; “новая”: 14 – UWO(PS) 80-45, 15 – UWO 85-256.1; “*phaseolosporus*”: 16 – ВКМ Y-1296 (Т), 17 – UCDFST 51-272, 18 – UCDFST 61-200; М – маркер молекулярных весов (п.н.) 100 bp DNA Ladder (“Fermentas”, Литва).

последовательности типовой культуры *K. lactis* var. *lactis* ВКМ Y-868).

У всех штаммов были определены нуклеотидные последовательности генов *EF-1α* и *ACT1*. Полученные нуклеотидные последовательности сравнили между собой и с соответствующими последовательностями *K. lactis* var. *lactis* CBS 683, NRRL Y-1140 и *K. lactis* var. *drosophilum* CBS 2105, имеющимися в GenBank. Идентичные *EF-1α*-последовательности имеют сбрасывающие лактозу штаммы *K. lactis* var. *lactis* и типовая культура *K. vanudenii* ВКМ Y-1535. С другой стороны, у всех европейских, среднеазиатских и североамериканских Лас<sup>-</sup> штаммов имеется общая транзигия Т → С в 661 позиции (согласно нумерации последовательности типовой культуры ВКМ Y-868), а у штаммов популяции “*phaseolosporus*” (ВКМ Y-1296, UCDFST 51-272 и UCDFST 61-200) выявлены дополнительные уникальные замены С → Т в 139 и 184 позициях.

Нуклеотидные последовательности гена *ACT1* оказались более вариабельными (более 20 замен), что позволило дифференцировать разные популяции дрожжей *K. lactis* (рис. 2). Штаммы var. *lactis* имеют идентичные *ACT1*-последовательности или отличаются 1–2 нуклеотидными заменами. Типовые культуры *K. lactis* var. *lactis* ВКМ Y-868 и *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 также имеют идентичные последовательности гена *ACT1*. Все остальные не утилизирующие лактозу штаммы характеризуются тремя общими транзигиями: Т → С (121 и 484 позиции) и А → G (196 позиция). Штаммы популяции “krassilnikovii” и среднеазиатские изоляты UCM Y-1891, UCM Y-1892 имеют идентичные *ACT1*-последовательности с уникальной транзигией G → А в 394 позиции. У всех штаммов популяций “*drosophilum*” и “новая” выявлено 8 уникальных одонуклеотидных замен, SNP (от английско-

	<i>ACT1</i>																			
	1	37	67	73	121	196	247	259	325	328	394	400	424	484	505	508	616	631	661	925
1. ВКМ Y-868 (Т)	С	Т	А	С	Т	А	С	Т	С	Т	Г	С	Т	Т	С	С	С	С	Т	Т
2. ВКМ Y-1535	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3. ВКМ Y-831	.	.	.	.	С	Г	.	.	.	А	.	.	С	.	.	.	.	.	.	.
4. UCM 1891	.	.	.	.	С	Г	.	.	.	А	.	.	С	.	.	.	.	.	.	.
5. ВКМ Y-1302 (Т)	.	.	Г	Т	С	Г	.	С	.	С	.	.	С	С	.	Т	Т	.	.	С
6. UWO 80-45	.	.	Г	Т	С	Г	.	С	.	С	.	.	С	С	.	Т	Т	.	.	С
7. ВКМ Y-1296	Т	А	.	.	С	Г	Т	.	Т	А	.	Т	.	С	Т	.	.	Т	С	.
8. UCDFST 61-200	Т	А	.	.	С	Г	Т	.	Т	А	.	Т	.	С	Т	.	.	Т	С	.

**Рис. 2.** Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена *ACT1* генетических популяций дрожжей *K. lactis*: 1 – *K. lactis* var. *lactis*, 2 – “vanudenii”, 3 – “krassilnikovii”, 4 – “среднеазиатская”, 5 – var. *drosophilaram*, 6 – “новая”, 7 и 8 – “phaseolosporus”. Идентичные нуклеотидные последовательности обозначены точками. Нумерация последовательностей приводится по типовой культуре *K. lactis* var. *lactis* (ВКМ Y-868). Т – типовая культура.

го Single Nucleotide Polymorphism). Наибольшее количество SNP обнаружено в *ACT1*-последовательностях типовой культуры *K. phaseolosporus* ВКМ Y-1296 и штаммов UCDFST 51-272, UCDFST 61-200: семь транзиций и две трансверсии Т → А в 37 и 328 позициях (рис. 2).

На основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей 5.8S-ITS-фрагмента, генов *EF-1α* и *ACT1* было построено филогенетическое древо (рис. 3). В качестве внешней группы использовали типовую культуру *K. marxianus* CBS 712. Изученные штаммы разделились на четыре кластера. В первом кластере с 96%-ной статистической поддержкой объединились сбрасывающие лактозу штаммы var. *lactis* и типовая культура *K. vanudenii* ВКМ Y-1535. Второй кластер сформировали среднеазиатские изоляты и штаммы европейской популяции “krassilnikovii”, имеющие идентичные ITS, *EF-1α* и *ACT1* последовательности. Только у штамма CBS 9059 имеется транзиция С → Т в 463 позиции гена *EF-1α*.

В третьем кластере (97% статистической поддержки) объединились штаммы популяций “новая” и “drosophilaram”, включая типовую культуру ВКМ Y-1302. Четвертый кластер (99% статистической поддержки) образован наиболее дивергентной популяцией “phaseolosporus” (рис. 3).

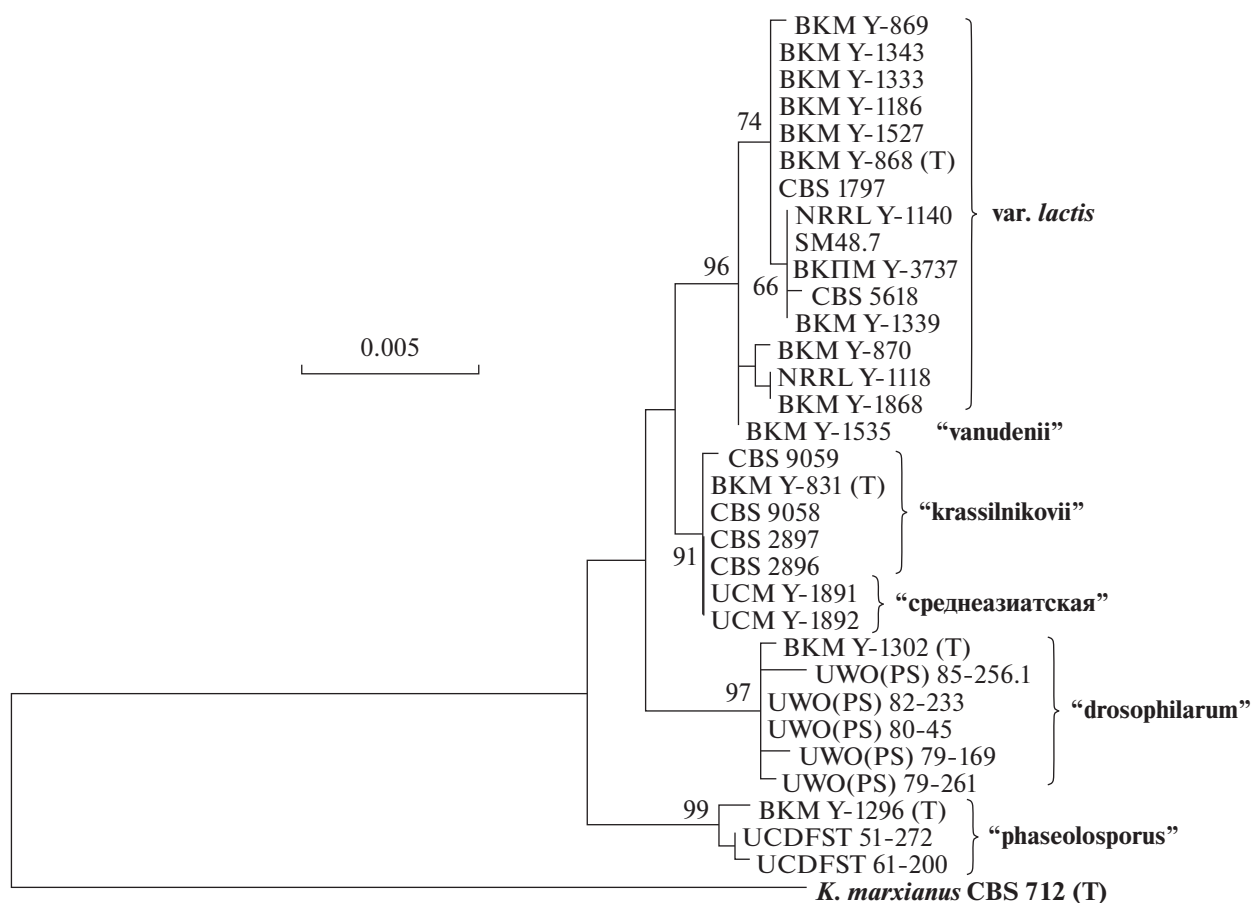
**Молекулярное кариотипирование.** Ранее использованные Belloch et al. (1998a, 2002) условия пульс-электрофореза не позволили добиться хорошего разделения хромосомных полос. Поэтому для достижения оптимального разделения хромосомных полос дрожжей *K. lactis* мы использовали два режима кариотипирования: 40-часовой и 120-часовой, представленные в разделе “Материалы и методы исследования”. Размеры хромосом определяли по кариотипическим стандартам *S. cerevisiae* YNN 295 и *W. canadensis* YB-4662-VIA. Молекулярные кариотипы некоторых штаммов при использовании 40-часового режима представле-

ны на рис. 4. Схема молекулярных кариотипов дрожжей *K. lactis*, составленная на основании двух электрофоретических режимов, приведена на рис. 5.

При использовании 40-часового электрофоретического режима ДНК изученных штаммов разделилась на 3–5 полос размером от 1100 до 2900 т.п.н. (рис. 4). Дрожжи var. *lactis* и природные европейские штаммы популяции “krassilnikovii” имеют практически идентичные кариотипы с пятью хромосомными полосами размером от 1000 до 2600 т.п.н. (рис. 4, дорожки 3–8). Отмечен незначительный полиморфизм размеров второй и третьей (снизу геля) хромосомных полос. Согласно интенсивности свечения окрашенных бромистым этидием электрофоретических полос, третья снизу полоса, по-видимому, содержит две хромосомы.

Хромосомная ДНК типовой культуры *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 и среднеазиатских штаммов UCM Y-1891, UCM Y-1892 также разделилась на пять хромосомных полос (рис. 4, дорожки 9–11). Для указанных штаммов характерно наличие трех хромосомных полос в диапазоне 1000–1600 т.п.н., вместо двух у штаммов var. *lactis* и популяции “krassilnikovii” (рис. 4). Кариотипический профиль *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 характеризуется наличием хромосомной полосы размером ~2700 т.п.н., а в кариотипе среднеазиатских штаммов самая верхняя хромосомная полоса имеет размер ~2900 т.п.н. (рис. 4, дорожки 9, 10 и 11). С помощью 120-часового режима кариотипирования было установлено, что у штамма ВКМ Y-1535 четвертая снизу полоса содержит две хромосомы (рис. 5).

Наименьший диапазон размеров хромосомных полос характерен для кариотипа типовой культуры *K. lactis* var. *drosophilaram* ВКМ Y-1302. Хромосомная ДНК этого штамма разделилась на четыре хромосомные полосы размером от 1600 до 2200 т.п.н. (рис. 4, дорожка 12). Самая верхняя и



**Рис. 3.** Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей 5.8S-ITS-участка, фактора элонгации EF-1 $\alpha$  и гена *ACT1* различных популяций дрожжей *Kluyveromyces lactis*. Приводятся значения бутстрэпа >70%. Шкала соответствует 5 нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. В качестве внешней группы использовали типовую культуру *K. marxianus* CBS 712. Т – типовая культура.

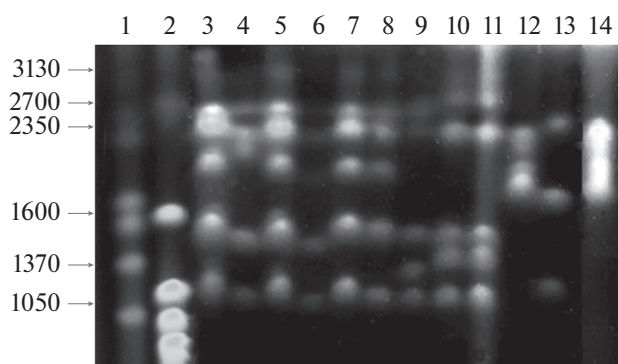
нижняя полосы, по-видимому, двойные. Такой же кариотипический профиль имеет штамм UWOPS 80-45 из популяции “новая” (рис. 4, дорожка 14). Уникальный кариотип имеет типовая культура *K. phaseolosporus* ВКМ Y-1296 (рис. 4, дорожка 13). Хромосомная ДНК этого штамма разделилась на три полосы размером от 1100 до 2500 т.п.н. Согласно интенсивности свечения, окрашенных бромистым этидием электрофоретических полос, все три полосы, по-видимому, двойные.

Таким образом, несмотря на значительный полиморфизм индивидуальных размеров электрофоретических полос, все изученные штаммы, по-видимому, имеют одинаковое гаплоидное число хромосом, равное шести.

Для определения генетического родства различных популяций и установления таксономического статуса среднеазиатских штаммов мы провели гибринологический анализ.

**Гибридизационный анализ.** В опытах по гибридизации использовали высокофертильные моноспоровые культуры гомоталлических штаммов ВКМ

Y-1296, ВКМ Y-1302, ВКМ Y-1535, ВКМ Y-1333, CBS 9058, UCDFST 61-200, UCM Y-1891 и моноколониальные клоны гетероталлических дрожжей NRRL Y-1118, NRRL Y-1140 и ВКМ Y-1339. Ауксотрофные мутанты получали с помощью УФ-облучения или на селективной 5-FOA-среде. Принимая во внимание гаплонтный жизненный цикл дрожжей *K. lactis*, комплементарные ауксотрофные мутанты были скрещены на голодной мальтозной среде с последующим отбором прототрофных гибридов на минимальной среде. Генетическое родство изученных штаммов определяли по жизнеспособности полового гибридного потомства (аскоспор) и рекомбинации контрольных родительских маркеров-ауксотрофностей (табл. 2). Все гибриды между штаммами var. *lactis* NRRL Y-1140, NRRL Y-1118, ВКМ Y-1333 и ВКМ Y-1339 были высокофертильны, с выживаемостью аскоспор 84–97% и регулярной мейотической сегрегацией контрольных ауксотрофных маркеров (табл. 2, гибриды № 1–4). Высокую выживаемость аскоспор (93%) также имел гибрид “krassilnikovii”  $\times$  var. *lactis*



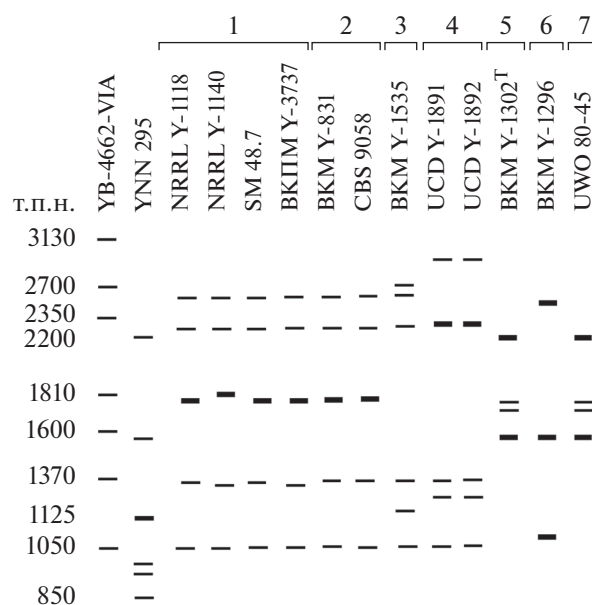
**Рис. 4.** Молекулярные кариотипы генетических популяций *Kluyveromyces lactis* при использовании 40-часового электрофоретического режима. Дрожжи: *K. lactis* var. *lactis*: 3 – ВКМ Y-868, 4 – NRRL Y-1140; 5 – SM 48.7; 6 – ВКПМ Y-3737; “krassilnikovii”: 7 – ВКМ Y-831, 8 – CBS 9058; 9 – “vanudenii” ВКМ Y-1535; “среднеазиатская”: 10 – UCM Y-1891, 11 – UCM Y-1892; 12 – var. *drosophilarum* ВКМ Y-1302; 13 – “phaseolosporus” ВКМ Y-1296; 14 – “новая” UWOPS 80-45. Хромосомные стандарты: 1 – *Hansenula wingeii* YB-4662-VIA; 2 – *Saccharomyces cerevisiae* YNN 295. Размеры хромосом (т.п.н.) приведены по стандартным штаммам.

(табл. 2, гибрид № 5). Хотя выживаемость аскоспор гибридов штамма UCM Y-1891 с var. *lactis* NRRL Y-1140 и *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 была несколько ниже (76 и 64% соответственно), также наблюдалась регулярная мейотическая сегрегация контрольных ауксотрофных маркеров (табл. 2, гибриды № 6 и 7).

Напротив, гибрид UCM Y-1891 × *K. drosophilarum* ВКМ Y-1302 имел низкую выживаемость аскоспор: 16% (табл. 2, гибрид № 8). Ранее нами было показано, что *K. drosophilarum* ВКМ Y-1302 образует со штаммами var. *lactis*, “krassilnikovii” и *K. vanudenii* полустерильные гибриды, имеющие, как правило, аномальную мейотическую сегрегацию контрольных маркеров (Naumov, Naumova, 2002).

На рис. 6 приведены суммарные результаты гибридологического анализа различных популяций дрожжей *K. lactis*, включая полученные в данной работе и ранее опубликованные данные (Naumov, Naumova, 2002). По выживаемости гибридных аскоспор изученные популяции разделились на две группы (рис. 6). Штаммы var. *lactis*, “krassilnikovii”, типовая культура *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 и среднеазиатские изоляты образуют фертильные гибриды (64–96% выживаемости аскоспор) с регулярной мейотической сегрегацией контрольных ауксотрофных маркеров.

Во вторую группу попали штаммы североамериканских популяций “*drosophilarum*” и “*phaseolosporus*”, образующие полустерильные гибриды: 12–24% выживаемости аскоспор (рис. 6). Гибриды между “*phaseolosporus*” и популяциями первой



**Рис. 5.** Суммарная схема молекулярных кариотипов дрожжей *K. lactis*: 1 – *K. lactis* var. *lactis*, 2 – “krassilnikovii”, 3 – “vanudenii”, 4 – “среднеазиатская”, 5 – var. *drosophilarum*, 6 – “phaseolosporus”, 7 – “новая”. Размеры хромосомных полос (т.п.н.) приводятся по стандартным штаммам *S. cerevisiae* YNN 295 и *H. wingeii* YB-4662-VIA. Использовались 40- и 120-часовые режима кариотипирования.

группы были стерильны или имели очень низкую выживаемость аскоспор: 0–20%. Гибриды “*drosophilarum*” × “*vanudenii*”, “*drosophilarum*” × “*phaseolosporus*”, “*drosophilarum*” × “*krassilnikovii*” и “*drosophilarum*” × var. *lactis* также были полустерильными: 6–9, 16, 20–34 и 10–45% выживаемости аскоспор соответственно. При этом, во всех комбинациях наблюдалось нерегулярное расщепление ауксотрофных маркеров. Даже в случае сравнительно высокой выживаемости полных тетрад (45%), отмеченной в некоторых комбинациях скрещиваний “*drosophilarum*” × var. *lactis*, не наблюдалось рекомбинации родительских ауксотрофных маркеров (Naumov, Naumova, 2002). Следует отметить, что внутривидовые гибриды “*phaseolosporus*” × “*phaseolosporus*” и “*drosophilarum*” × “*drosophilarum*” имели высокую выживаемость аскоспор (63–98 и 97–100% соответственно) и характеризовались нормальной дигенной сегрегацией контрольных маркеров ауксотрофности (рис. 6).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное молекулярно-генетическое исследование показало сложное строение вида *K. lactis* и подтвердило правильность выделения сбразивающих лактозу штаммов в отдельную разновидность *K. lactis* var. *lactis*, предложенную на основании фи-



**Таблица 2.** Тетрадный анализ внутри- и межпопуляционных гибридов *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* (NRRL Y-1118, NRRL Y-1140, ВКМ Y-1333, ВКМ Y-1339), var. *drosophilarum* (ВКМ Y-1302), “phaseolosporus” (ВКМ Y-1296, UCDFST 61-200), “krassilnikovii” (CBS 9058), “vanudenii” (ВКМ Y-1535) и “среднеазиатская” (UCM Y-1891)

№ гибрида	Гибриды	Число тетрад	Жизнеспособность спор, %	Расщепление* аВ : Ab : АВ : ab	Генотипы гибридов
<i>var. lactis</i> × <i>var. lactis</i>					
1	1118 ( <i>lys</i> ) × 1333 ( <i>met9</i> )	82	91	11P : 8N : 39T	<i>MATα lys MET9/LYS met9</i>
2	1140 ( <i>his</i> ) × 1333 ( <i>met9</i> )	82	88	9P : 6N : 33T	<i>MATα his MET9/HIS met9</i>
3	1118 ( <i>lys</i> ) × 1339 ( <i>met5</i> )	85	84	9P : 5N : 19T	<i>MATα lys MET5/MATα LYS met5</i>
4	1333 ( <i>trp7</i> ) × 1339 ( <i>met5</i> )	43	97	10P : 6N : 24T	<i>trp7 MET5/MATα TRP7 met5</i>
“krassilnikovii” × <i>var. lactis</i>					
5	9058 ( <i>ura6-2</i> ) × 1140 ( <i>his</i> )	35	93	3P : 5N : 18T	<i>ura6-2 HIS/MATα URA6-2 his</i>
“среднеазиатская” × <i>var. lactis</i>					
6	1891 ( <i>ura</i> ) × 1140 ( <i>his</i> )	30	76	4P : 4N : 9T	<i>ura HIS/MATα URA his</i>
“среднеазиатская” × “vanudenii”					
7	1891 ( <i>ura</i> ) × 1535 ( <i>lys</i> )	25	64	3 : 14 : 28 : 19	<i>lys URA/LYS ura</i>
“среднеазиатская” × <i>var. drosophilarum</i>					
8	1891 ( <i>ura</i> ) × 1302 ( <i>his1</i> )	11	16	2 : 2 : 2 : 1	<i>ura HIS1/URA his1</i>
“phaseolosporus” × “phaseolosporus”					
9	1296 ( <i>lys</i> ) × 61–200 ( <i>ura</i> )	24	63	2P : 2N : 4T	<i>lys URA/LYS ura</i>

\* P, N, T – тетрады родительского, неродительского дитипов и тетратипа соответственно. a, b – аукотрофности первого (до знака скрещиваемости) и второго родителя соответственно; A, B – прототрофности.

зиологических и экологических критериев (Sidenberg, Lachance, 1983, 1986; Lachance, 2011). Штаммы *var. lactis* имеют идентичные IGS2-ПДРФ-паттерны и молекулярные кариотипы, не отличаются по нуклеотидным последовательностям ряда молекулярных маркеров и образуют фертильные гибриды: 84–99% выживаемости аскоспор. К этой разновидности относятся штаммы, выделенные из различных молочных продуктов, клинические изоляты и почвенный штамм ВКПМ Y-3737 (табл. 1). Сбраживающие лактозу дрожжи ассоциированы с молочными продуктами и млекопитающими и, по-видимому, являются родоначальниками клинических изолятов. Ранее нами было установлено, что молочные и госпитальные штаммы также имеют идентичные ПЦР-профили с микросателлитным праймером (GTG)<sub>5</sub> (Наумова и соавт., 2005). Согласно литературным данным, клинические изоляты *Saccharomyces cerevisiae* по многим молекулярным маркерам не отличаются от пекарских штаммов и, очевидно, происходят от них (Hennequin et al., 2001; de Llanos et al., 2004; Imre et al., 2019). Сбраживающий лактозу штамм ВКПМ Y-3737 был выделен из почвы в Измайловском парке Москвы (Наумов и соавт., 2014). Этот штамм по всем изученным молекулярным маркерам не отличается от типовой культуры *var. lactis* ВКМ Y-868. По-видимому, молочные дрожжи в природе могут распространяться с участием ди-

ких млекопитающих, кормящих потомство молоком. Другим источником их распространения в природе может быть молочное скотоводство.

С другой стороны, полученные нами молекулярные и генетические данные указывают на то, что не сбраживающие лактозу дрожжи разновидности *K. lactis* var. *drosophilarum* относятся к трем генетически изолированным популяциям: “krassilnikovii”, “drosophilarum” и “phaseolosporus”. Указанные популяции характеризуются различными молекулярными кариотипами, уникальными SNP-заменами в гене *ACT1* и образуют полустерильные гибриды: 6–34% выживаемости аскоспор. К популяции “krassilnikovii” относятся европейские и среднеазиатские изоляты, тогда как популяции “drosophilarum” и “phaseolosporus” представлены североамериканскими штаммами. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными. Типовые культуры *K. drosophilarum* ВКМ Y-1302 и *K. phaseolosporus* ВКМ Y-1296 имеют 70–83.4% ДНК–ДНК реассоциации, а с типовой культурой *K. lactis* var. *lactis* ВКМ Y-868: 70–79.9 и 70–90.2% соответственно (Martini, 1973; Fuson et al., 1987). Гибриды *var. lactis* × “drosophilarum” и *var. lactis* × “phaseolosporus” полностью стерильны или имеют низкую выживаемость аскоспор: 0–45% (Naumov, Naumova, 2002). Следует отметить высокую выживаемость аскоспор (66–96%) при гибридизации различных штаммов “krassil-

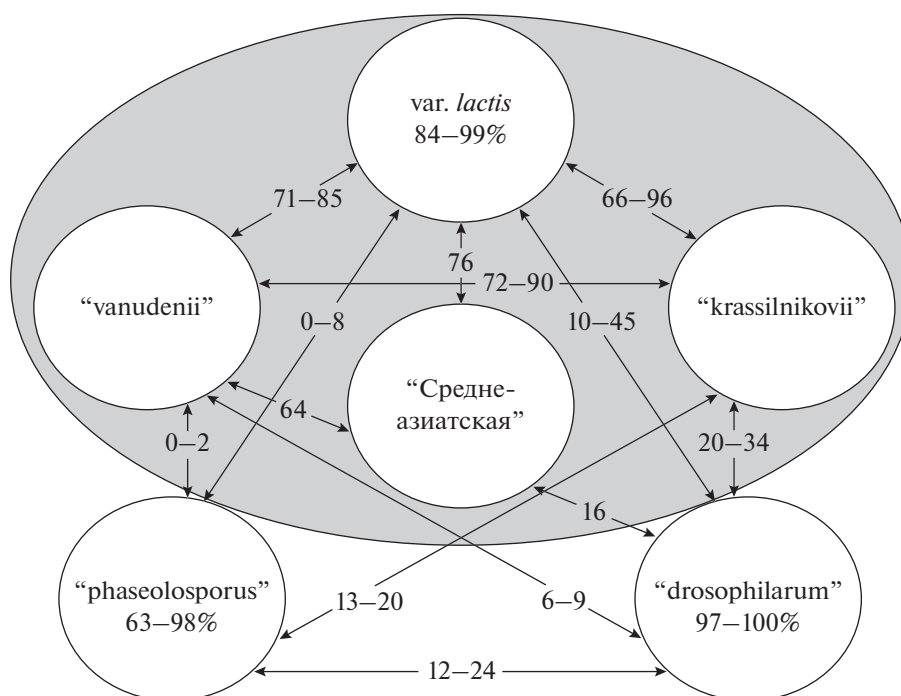


Рис. 6. Суммарные результаты гибридологического анализа генетических популяций дрожжей *Kluyveromyces lactis* (Naumov, Naumova, 2002; настоящее исследование).

nikovii” (ВКМ Y-831, ВКМ Y-834, CBS 2877, CBS 2896, CBS 9057, CBS 9058 и СЕСТ 1122) и var. *lactis* NRRL Y-1140 и NRRL Y-1118, которая сопоставима с фертильностью при скрещивании разных штаммов var. *lactis*: 84–99% (Naumov, Naumova, 2002; настоящее исследование). Полное отсутствие генетической изоляции указывает на то, что природные изоляты “krassilnikovii” являются прародителями культурных молочных дрожжей *K. lactis* var. *lactis* (Наумов, 2000; Наумов и соавт., 2006). Особое внимание заслуживают не утилизирующие лактозу дрожжи *K. vanudenii*, образующие фертильные гибриды с var. *lactis* и популяцией “krassilnikovii”, включая среднеазиатские штаммы: 64–90% (рис. 6). *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 не отличается от типовой культуры *K. lactis* var. *lactis* ВКМ Y-868 по IGS2-паттернам, ITS, *EF-1α* и *ACT1* последовательностям. Штамм ВКМ Y-1535 имеет 97% ДНК–ДНК реассоциации с типовой культурой *K. lactis* var. *lactis* ВКМ Y-868, что сопоставимо с ДНК–ДНК реассоциацией разных штаммов var. *lactis*: 96–100% (Bicknell, Douglas, 1970; Martini, 1973; Fuson et al., 1987). По молекулярному кариотипу дрожжи *K. vanudenii* наиболее сходны со среднеазиатскими штаммами популяции “krassilnikovii”. Полногеномное секвенирование этих дрожжей и последующий сравнительный анализ с геномом штамма *K. lactis* var. *lactis* NRRL Y-1140 поможет прояснить таксономический статус *K. vanudenii* ВКМ Y-1535. Принимая во внимание средиземноморское происхождение винных дрож-

жей (Almeida et al., 2015), дрожжи *K. vanudenii* ВКМ Y-1535, выделенные с оборудования винограда в Южной Африке, также могут иметь европейское происхождение.

В современной систематике для видовой идентификации аскомицетовых дрожжей используется филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей ряда молекулярных маркеров (баркодов), прежде всего домена D1/D2 гена 26S рРНК и 5.8S-ITS-фрагмента (Schoch et al., 2012; Vu et al., 2016). Последний маркер используется также для изучения внутривидовой изменчивости различных дрожжей и дифференциации генетических популяций. Сравнительный анализ дискриминационного потенциала трех использованных нами молекулярных маркеров показал, что с помощью ITS-участка и гена *EF-1α* можно четко разделить штаммы *K. lactis* var. *lactis* от не усваивающих лактозу популяций “krassilnikovii”, “drosophilorum” и “phaseolosporus”. В то же время, все четыре генетические популяции могут быть дифференцированы только на основании нуклеотидных последовательностей гена *ACT1*. На примере различных родов аскомицетных дрожжей было показано, что, во многих случаях, ген *ACT1* является предпочтительным маркером по сравнению с последовательностями рДНК (Daniel, Meyer, 2003). Принимая во внимание, что в GenBank уже имеется достаточно обширная база данных дрожжевых последовательностей гена *ACT1*, этот мар-

кер может быть рекомендован для идентификации внутривидовых популяций дрожжей *K. lactis*.

Молекулярно-генетическое изучение не утилизирующих лактозу штаммов из североамериканской (“водная” и “pseudovanudenii”) и дальневосточной (“восточная”) популяций (Naumova et al., 2004) позволит установить их таксономический статус и разработать формальную классификацию вида *K. lactis*.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование было поддержано совместным российско-тайваньским грантом РФФИ (№ 18-54-52002МНТ\_а).

#### 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

- Наумов Г.И. Дикий европейский вид *Zygofabospora krassilnikovii* – прародитель молочных дрожжей *Z. lactis* // Доклады АН. 2000. Т. 372. С. 846–849.
- Naumov G.I. Wild European species *Zygofabospora krassilnikovii* is an ancestor of the dairy yeast *Z. lactis* // Dokl. Biol. Sci. 2000. V. 372. P. 321–324.
- Наумов Г.И., Наумова Е.С., Баррио Е., Керол А. Генетическое и молекулярное изучение неспособности дрожжей *Kluyveromyces lactis* var. *drosophilorum* сбраживать лактозу // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 299–304.
- Naumov G.I., Naumova E.S., Barrio E., Querol A. Genetic and molecular study of inability of the yeast *Kluyveromyces lactis* var. *drosophilorum* to ferment lactose // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 248–252.
- Наумов Г.И., Наумова Е.С., Глушакова А.М., Качалкин А.В., Чернов И.Ю. Обнаружение молочных дрожжей *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* в природе // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 677–681.
- Naumov G.I., Naumova E.S., Glushakova A.M., Kachalkin A.V., Chernov I.Yu. Finding of dairy yeasts *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* in natural habitats // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 782–786.
- 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.
- Almeida P., Barbosa R., Zalar P., Imanishi Y., Shimizu K., Turchetti B., Legras J.L., Serra M., Dequin S., Couloux A., Guy J., Bensasson D., Gonçalves P., Sampaio J.P. A population genomics insight into the Mediterranean origins of wine yeast domestication // Mol. Ecol. 2015. V. 24. P. 5412–5427.
- 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., Barrio E., Garcia M.D., Querol A. Inter- and intraspecific chromosome pattern variation in the yeast genus *Kluyveromyces* // Yeast. 1998a. V. 14. P. 1341–1354.
- Belloch C., Barrio E., Garcia M.D., Querol A. Phylogenetic reconstruction of the yeast genus *Kluyveromyces*: restriction map analysis of the 5.8S rDNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers // Syst. Appl. Microbiol. 1998b. V. 21. P. 266–273.
- 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.
- 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.
- Bicknell J.N., Douglas H.C. Nucleic acid homologies among species of *Saccharomyces* // J. Bacteriol. 1970. V. 101. P. 505–512.
- Boeke J.D., LaCroute F., Fink G.R. A positive selection for mutants lacking orotidine-5' phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance // Mol. Genet. 1984. V. 197. P. 345–346.
- Daniel H.-M., Meyer W. Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeast // Int. J. Food Microbiol. 2003. V. 86. P. 61–78.
- de Llanos R., Querol A., Planes A.M., Fernandez-Espinar M.T. Molecular characterization of clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates and their association with non-clinical strains // Syst. Appl. Microbiol. 2004. V. 27. P. 427–435.
- Fuson G.B., Presley H.L., Phaff H.J. Deoxyribonucleic acid base sequence relatedness among members of the yeast genus *Kluyveromyces* // Int. J. System. Bacteriol. 1987. V. 37. P. 371–379.
- Hennequin C., Thierry A., Richard G.F., Lecoindre G., Nguyen H.-V., Gaillardin C., Dujon B. Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains // J. Clin. Microbiol. 2001. V. 3. P. 551–559.
- Imre A., Rácz H.V., Antunovic Z., Rádai Z., Kovács R., Lopandic K., Pócsi I., Pfliegler W.P. A new, rapid multiplex PCR method identifies frequent probiotic origin among clinical *Saccharomyces* isolates // Microbiol. Res. 2019. V. 227. P. 126298.
- Kudrjawzew W.I. Die Systematik der Hefen. Berlin, Academic Verlag, 1960. 276 p.
- 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.
- Lachance M. Current status of *Kluyveromyces* systematic // FEMS Yeast Res. 2007. V. 7. P. 642–645.
- 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.
- Löoke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications // Bio-techniques. 2011. V. 50. P. 325–328.

- Martini A. Ibridazione DNA/DNA tra specie di lieviti del genere *Kluyveromyces* // Ann. Fac. Agr. Univ. Perugia. 1973. V. 28. P. 1–15.
- Molnar O., Prillinger H., Lopandic K., Weigang F., Staudacher E. Analysis of coenzyme Q systems, monosaccharide patterns of purified cell walls, and RAPD-PCR patterns in the genus *Kluyveromyces* // Antonie van Leeuwenhoek. 1996. V. 70. P. 67–78.
- Naumov G.I., Naumova E.S. Five new combinations in the yeast genus *Zygothripspora* Kudriavzev emend. G. Naumov (pro parte *Kluyveromyces*) based on genetic data // FEMS Yeast Res. 2002. V. 2. P. 39–46.
- Naumova E.S., Sukhotina N.N., Naumov G.I. Molecular-genetic differentiation of the dairy yeast *Kluyveromyces lactis* and its closest wild relatives // FEMS Yeast Res. 2004. V. 5. P. 263–269.
- Nguyen H.-V., Pulvirenti A., Gaillardin C. Rapid differentiation of the closely related *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* and *K. marxianus* strains isolated from dairy products using selective media and PCR/RFLP of the rDNA non-transcribed spacer 2 // Can. J. Microbiol. 2000. V. 46. P. 1115–1122.
- Ragnini A., Fukuhara H. Mitochondrial DNA of the yeasts *Kluyveromyces*: guanine-cytosine rich sequence clusters // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 8433–8442.
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W. Fungal Barcoding Consortium (2012) 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. Speciation, species delineation, and electrophoretic isoenzyme patterns of the type strains of *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt // Int. J. Syst. Bacteriol. 1983. V. 33. P. 822–828.
- Sidenberg D.G., Lachance M.-A. Electrophoretic isoenzyme variation in *Kluyveromyces* population and revision of *Kluyveromyces marxianus* (Hansen) van der Walt // Int. J. Syst. Bacteriol. 1986. V. 36. P. 94–102.
- Sor F., Fukuhara H. Analysis of chromosomal DNA patterns of the Genus *Kluyveromyces* // Yeast. 1989. V. 5. P. 1–10.
- van der Walt J.P. *Kluyveromyces* (van der Walt) emend. van der Walt // The Yeasts. A Taxonomic Study / Ed. J. Lodder. 2nd edn. Amsterdam: North Holland Publishing, 1970. P. 316–378.
- 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.
- White T.J., Bruns T., Lee E., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR protocols: a guide to methods and applications. N.Y.: Academic Press, 1990. P. 315–322.

## Intraspecific Polymorphism of the Yeast *Kluyveromyces lactis*: Genetic Populations

L. V. Lyutova<sup>1, 2</sup>, G. I. Naumov<sup>1, †</sup>, A. V. Shnyreva<sup>2</sup>, and E. S. Naumova<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, NRC “Kurchatov Institute”, Moscow, 123098 Russia

<sup>2</sup>Department of Mycology and Algology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: lena\_naumova@yahoo.com

Received March 10, 2022; revised March 25, 2022; accepted March 26, 2022

**Abstract**—According to the modern classification of yeasts, the species *Kluyveromyces lactis* includes two taxonomic varieties: cultural dairy yeast *K. lactis* var. *lactis* and non-lactose fermenting environmental strains of *K. lactis* var. *drosophilarum*. This subdivision of the species, which is based only on phenotypic and ecological criteria, is formal and does not reflect the existing heterogeneity of *K. lactis*. Using various molecular methods and genetic hybridization analysis, we studied the genetic relationship of 35 *K. lactis* strains isolated from dairy products and environmental sources in different regions of the world. The lactose-fermenting yeast *K. lactis*, including dairy strains, clinical and soil isolates, had identical molecular karyotypes, did not differ in the nucleotide sequences of a number of molecular markers, and formed fertile hybrids with 84–99% ascospore viability. On the other hand, non-lactose fermenting yeasts split into three genetically isolated populations: “krassilnikovii,” “drosophilarum,” and “phaseolosporus,” which differed in molecular karyotypes, had unique SNP substitutions in the *ACT1* gene, and formed semisterile hybrids: 6–34% ascospore viability. Despite profound chromosome length polymorphism, *K. lactis* var. *lactis*, “krassilnikovii,” “drosophilarum,” and “phaseolosporus” probably have the same haploid number of chromosomes, equal to six. The largest range of chromosomal sizes was observed in “krassilnikovii” (1000–2900 kb), and the smallest in “drosophilarum” (1600–2300 kb). The biogeography of the yeast *K. lactis* is noteworthy. Lactose-fermenting strains of *K. lactis* var. *lactis* have been isolated in various regions of the world. Genetic populations “drosophilarum” and “phaseolosporus” are typical of North America, while “krassilnikovii” is represented by European and Central Asian isolates. Comparative analysis of the *ACT1* sequences should be applied for reliable delineation of all four genetic populations of *K. lactis*.

**Keywords:** *Kluyveromyces lactis* yeasts, genetic populations, phylogenetic and hybridization analyses, molecular karyotyping, nuclear gene *ACT1*