

УДК 575.174:577.152.321:579.25:582.282

Филогенетический анализ пектиназ аскомицетных дрожжей

© 2017 М.Ю. ШАЛАМИТСКИЙ^{1,2}, Г.И. НАУМОВ^{2,*}

¹ФГБУ «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач»» Российской академии наук, Ялта, 298600

²ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» Национального исследовательского центра «Курчатовский Институт» (НИЦ «Курчатовский Институт» – ГосНИИгенетика) Москва, 117545

e-mail: gnaumov@yahoo.com*

Поступила 28.08.2017 г.

Принята в печать 03.10.2017 г.

Проведен скрининг суперсемейства дивергентных видоспецифичных генов *PGU* у аскомицетных дрожжей в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk>). Обнаружено, что дивергентными пектиназными генами обладают виды р. *Eremothecium*, *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Kluveromyces* и *Lachancea*. Внутри родов наблюдался следующий уровень сходства нуклеотидных последовательностей генов *PGU*: 64,5–98,2% для *Kluveromyces*, 72,7–81,3% для *Galactomyces/Geotrichum* и 69–87,9% для *Eremothecium*. Полимерные гены *PGU*, способные к межвидовому перемещению, найдены у дрожжей *Galactomyces citri-aurantii*, *Geotrichum klebahnii* и *Galactomyces candidus*. Обсуждается значение генов *PGU* для диагностики и селекции дрожжей.

Ключевые слова: пектин, эндополигалактуроназа, пектиназа дрожжей, ген *PGU*, *Eremothecium*, *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Kluveromyces*, *Lachancea*.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-28-36

До самого последнего времени значение пектина как источника углерода для микроорганизмов явно недооценивалось. Только наличие в молекуле пектина метильной группы позволило исследователям получить представление о поистине планетарных масштабах связывания растениями метанола и роли в этом процессе пектина. Заметим также, что открыто большое количество видов метанолусваивающих дрожжей, ассоциированных с растениями. Полигалактуроновая составляющая пектина является важной частью углеводного питания микроорганизмов, включая дрожжи. Не случайно в дрожжевом определителе [1] присутствует дифференцирующий тест на утилизацию галактуроновой кислоты, которая является продуктом ферментативной деструкции пектина.

Пектин, один из основных полисахаридов растительного происхождения, представляет собой полимер с молекулярной массой от 20000 до 50000, состоящий из соединенных между собой альфа-(1,4)-гликозидной связью остатков в той или иной степени метилированной галактуроновой кислоты. Биохимическая деструкция пек-

тина – сложный процесс, протекающий с участием многих ферментов [2]. Наиболее генетически изученной является пектиназа дрожжей р. *Saccharomyces* [3]. Эта эндополигалактуроназа (К.Ф. 3.2.1.15) катализирует гидролиз альфа-(1,4)-гликозидных связей между остатками галактуроновой кислоты, не содержащими метоксильные группы, с образованием олигогалактуронат. Фермент используется для ферментации чая и кофе, очистки растительных волокон, например, льна, осветления и фильтрации соков из ягод и плодов, а также виноградного сока и вина [2].

Несмотря на то, что пектинолитическая активность дрожжей привлекает внимание исследователей с середины прошлого века [4–6], имеются только отдельные сообщения о дрожжах, синтезирующих пектиназу [7–9]. Исключением, как уже говорилось выше, являются пектинолитические дрожжи р. *Saccharomyces* [3]. Можно отметить приоритет отечественных работ [10, 11] по селекции винных дрожжей *Saccharomyces*, обладающих пектиназной активностью.

Данное исследование является продолжением опубликованной ранее работы по изучению степени гомологии суперсемейства пектиназных генов *PGU* дрожжей р. *Saccharomyces* с нуклеотидной последовательностью *PGU1*, принадлежащей *S. cerevisiae* S288с [3].

Задача настоящего исследования состояла в том, чтобы на основе гомологии с нуклеотидной последовательностью известного гена *PGU1* и соответствующей аминокислотной последовательностью эндополигалактуроназы дрожжей *S. cerevisiae* S288с обнаружить в геномных базах данных последовательности генов *PGU* у дрожжей-аскомицетов и установить степень их межвидовой и внутривидовой дивергенции.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Характеристики 26 изученных штаммов аскомицетов и их происхождение приведены в таблице.

Поиск гомологов в базах данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk>) с рамкой считывания (1086 пн) известной нуклеотидной последовательности гена *PGU1* (GenBank: BK0069431) дрожжей *S. cerevisiae* S288с проводили с помощью программы BLAST. Множественные выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили вручную, используя программу BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/>)

Таблица

Генетические свойства и происхождение изученных аскомицетных дрожжей

Genetic characteristics and origin of ascomycetous yeasts studied

| Штамм (коллекция) | Генотип | Источник выделения, страна | Номер в GenBank | Ссылка |
|--|--|--|--|--------|
| <i>Saccharomyces arboricola</i> H-6 | – | Кора дуба <i>Quercus fabri</i> , Китай | CM001572 | [12] |
| <i>S. bayanus</i> var. <i>uvarum</i> MCYC 623 | <i>PGU1b</i> <i>PGU2b</i> <i>PGU3b</i> | Ручейник <i>Mesophylax adopersus</i> , Испания | AACA01000043; AACA01000682; AACA01000194 | [13] |
| <i>S. bayanus</i> CBS 395 | <i>PGU1b</i> | Сок <i>Ribes nigrum</i> , Нидерланды | FR847037 | [14] |
| <i>S. cerevisiae</i> S288с | <i>PGU1</i> | Генетическая линия | BK006943 | [15] |
| <i>S. mikatae</i> IFO 1815 | – | Почва, Япония | AABZ01000345 | [13] |
| <i>S. kudriavzevii</i> IFO 1802 | – | Гниющие листья, Япония | JH797534 | [16] |
| <i>S. paradoxus</i> CBS 432 | – | Кора дуба <i>Quercus</i> sp., Россия | AABY01000004 | [13] |
| <i>S. pastorianus</i> NRRLY-1551 | – | Пиво, Дания | FR847040 | [14] |
| <i>Lachancea kluyveri</i> NRRL Y-12651 | – | <i>Drosophila pinicola</i> , США | CM000688 | [16] |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC1777 | – | Почва, Япония | AP014599 | [17] |
| <i>K. marxianus</i> KCTC17555 | – | Кукурузное тесто, Мексика | KQ039398 | [18] |
| <i>K. marxianus</i> DMKU3-1042 | – | Селекционированный штамм | AP012213 | [19] |
| <i>K. marxianus</i> CCT 7735 | – | Молочный завод, Бразилия | CP009303 | [20] |
| <i>K. marxianus</i> CECT1043 | <i>EPG1-2</i> | Сливки, США | AY426825 | [21] |
| <i>K. marxianus</i> BKM Y-719 | <i>EPG1</i> | Ягоды винограда | AJ000076 | [22] |
| <i>K. wickerhamii</i> | <i>PGW1</i> | – | AB059425 | - |
| <i>K. wickerhamii</i> UCDFST 54-210 | – | <i>Drosophila</i> sp., США | AEAV01000501 | [23] |
| <i>Galactomyces citri-aurantii</i> IJ-1 | <i>PG1</i> <i>PG2</i> | Гнилая кожура цитруса, Южная Корея | JQ337943 JQ337944 | [24] |
| <i>G. candidus</i> S31 | <i>S31PG1</i> <i>S31PG2</i> | Почва у <i>Citrus unshiu</i> , Япония | AB099408 AB099409 | [25] |
| <i>G. geotrichum</i> S63 | <i>S63PG1</i> | То же | AB062511 | [25] |

| Штамм (коллекция) | Генотип | Источник выделения, страна | Номер в GenBank | Ссылка |
|---|---------------|-----------------------------------|-----------------|--------|
| <i>G. geotrichum</i> Ap2 | <i>Ap2PG1</i> | Япония | AB083112 | [26] |
| <i>Geotrichum klebahnii</i> B2 | <i>PSE3</i> | Мутант штамма SN03 | D89650 | [27] |
| <i>Eremothecium gossypii</i> ATCC 10895 | – | <i>Brachynera germarii</i> , Иран | AE016817 | [28] |
| <i>E. gossypii</i> FDAG1 | – | <i>Oncopeltus fasciatus</i> , США | CP002708 | [29] |
| <i>E. symbalariae</i> DBVPG7215 | – | <i>Brachynera germarii</i> , Иран | CP002501 | [30] |
| <i>Eremothecium</i> sp. | – | <i>Boisea trivittata</i> | CP006024 | [29] |

Примечание: соответствие номеров штаммов из разных коллекций: H-6 = CBS10644; МСУС 623 = CBS7001; КСТС 17555 = CBS 6556, UCDFST 54-210 = CBS 2745, ATCC 10895 = CBS 1095, DBVPG 7215 = CBS 270.75, ССТ 7735 = UFV-3. Используются следующие сокращения названий коллекций: ВКМ (VKM) – Всероссийская коллекция микроорганизмов, Москва; ATCC – American Type Culture Collection, Манассас, США; CBS – Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Утрехт, Нидерланды; СЕСТ – Spanish Type Culture Collection, University of Valencia, Испания; DBVPG, Dipartimento di Biologia Vegetale Università di Perugia, Италия; DMKU – Department of Microbiology Kasetsart University, Бангкок, Тайланд; IFO (=NBRC), Institute for Fermentation, Осака, Япония; КСТС – Korean Collection for Type Cultures, Genetic Resources Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Тэджон, Южная Корея; МСУС – Departamento de Microbiología, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Испания; NBRC (=IFO) – NITE Biological Resource Center, Осака, Япония; NCYC – National Collection of Yeast Cultures, Норидж, Англия; NRRL – Northern Region Research Center, Пеория, США; UCDFST – Department of Food Science and Technology, University of California, Девис, Калифорния, США; UFV – Universidade Federal de Viçosa, Бразилия. «ВКМ Y-719» – неверный номер штамма *K. marxianus* (в действительности под этим номером во Всероссийской коллекции микроорганизмов хранятся дрожжи *Torulaspora delbrueckii* CBS 158).

(–) – генотип или источник выделения неизвестен.

Footnote: Strain numbers from different collections correspond as follows: H-6 = CBS10644, МСУС 623 = CBS7001, КСТС 17555 = CBS 6556, UCD 54-210 = CBS 2745, ATCC 10895 = CBS 1095, DBVPG 7215 = CBS 270.75, ССТ 7735 = UFV-3. Acronyms for culture collections are as follows: VKM – All-Russian collection of microorganisms, Moscow; ATCC – American Type Culture Collection, Manassas, USA; CBS – the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands; СЕСТ – Spanish Type Culture Collection University of Valencia, Spain; DBVPG, Dipartimento di Biologia Vegetale Università di Perugia, Italy; DMKU – Department of Microbiology Kasetsart University, Bangkok, Thailand; IFO (=NBRC), Institute for Fermentation, Osaka Japan; КСТС – Korean Collection for Type Cultures, Genetic Resources Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, South Korea; МСУС – Departamento de Microbiología, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Spain; NBRC (=IFO) – NITE Biological Resource Center, Osaka, Japan; NCYC – National Collection of Yeast Cultures, Norwich, UK; NRRL – Northern Region Research Center, Peoria, USA; UCDFST – Department of Food Science and Technology, University of California, Davis, California, USA; UFV – Universidade Federal de Viçosa, Brazil. Authors [22] indicated incorrectly number of *K. marxianus* strain «VKM Y-719»; in fact, the yeast *Torulaspora delbrueckii* CBS 158 having a completely different origin, is maintained under this number in the All-Russian Collection of Microorganisms. (–) – unknown.

BioEdit/bioedit.html). Филогенетические деревья строили методом объединения соседей (neighbor-joining) в программе MEGA 6 [31].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В наших предыдущих работах [3, 32, 33] у 115 штаммов дрожжей *Saccharomyces*, отнесенных к биологическим видам *S. arboricola*, *S. bayanus* (var. *ivarum*), *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus* и гибриднему таксону *S. pastorianus* (syn. *S. carlsbergensis*), обнаружено суперсемейство дивергентных видоспецифичных генов *PGU*. Показан также природный межвидовой перенос гена *PGU* из *S. cerevisiae* в *S. bayanus* и из *S. paradoxus* в *S. cerevisiae*.

Проведенный в настоящей работе филогенетический анализ позволил выявить ряд четко обособленных кластеров генов *PGU*, которые полностью соответствуют родовой принадлежности анализируемых дрожжей-аскомицетов (рис. 1).

Первый кластер у дрожжей *Saccharomyces* был детально проанализирован нами ранее (см. выше). Поэтому на представленном древе (см. рис. 1) для сравнения приведены гены *PGU* только типовых и реперных штаммов видов данного рода.

К первому кластеру примыкает самостоятельная ветвь – ген *PGU* дрожжей *Lachancea kluyveri* NRRL Y-12651. Вероятно, дополнительное привлечение других видов этого политипного рода [1] приведет к появлению полноценного второго кластера.

Третий кластер состоит из генов *PGU* двух видов рода *Kluyveromyces*: *K. marxianus* и *K. wickerhamii*. Отметим высокий уровень сходства аллелей *PGU* (97,7–98,2%) у всех пяти штаммов *K. marxianus*, тогда как внутри рода различия более существенные (64,5).

Четвертый кластер представлен дрожжеподобными грибами р. *Galactomyces* и *Geotrichum* со степенью гомологии генов *PGU* 72,7–81,3%. Здесь необходимо отметить образование дивергентных генов *PGU* (наличие суперсемейств) внутри видов *Galactomyces geotrichum*, *Galactomyces*

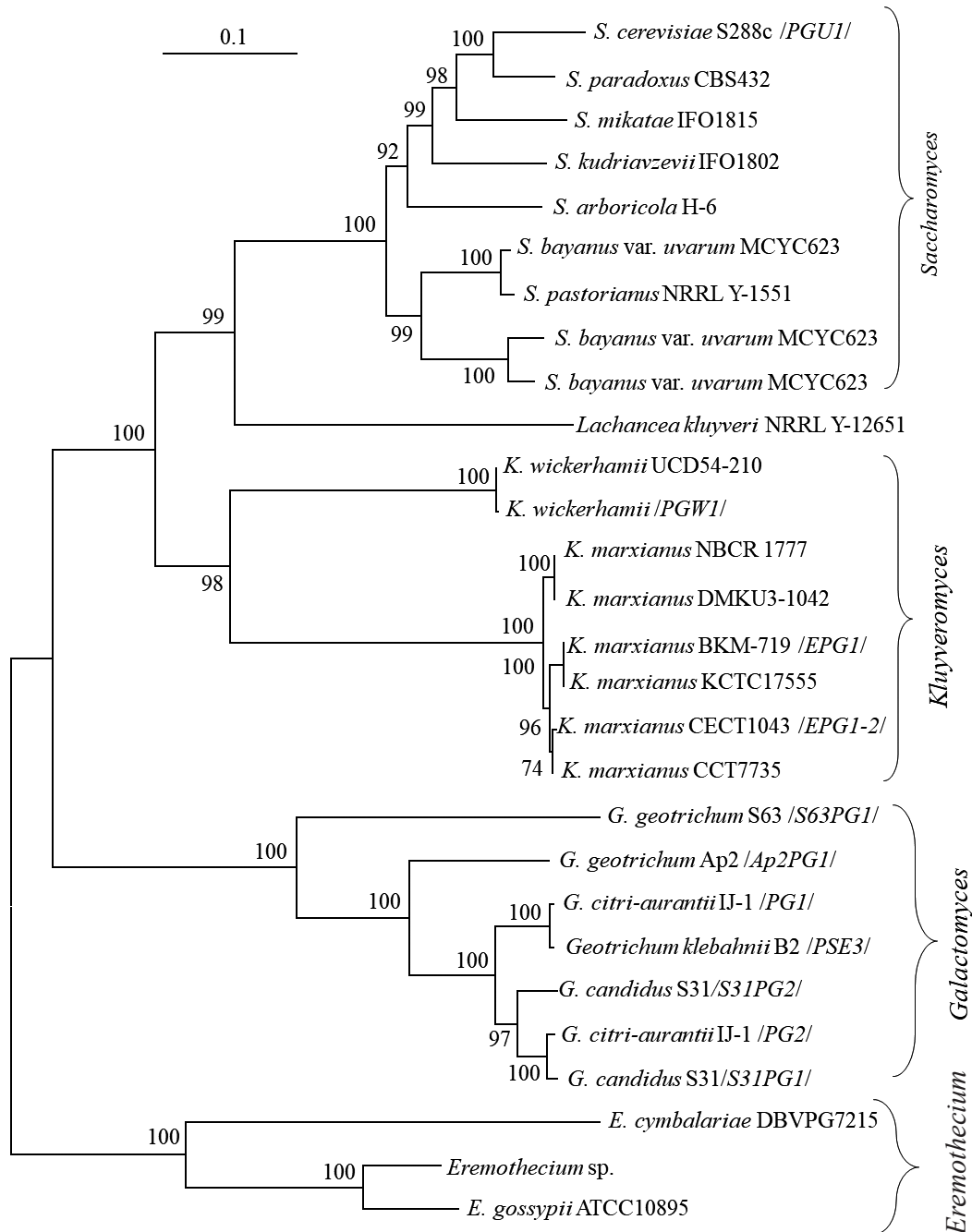


Рис. 1. Филогенетическое древо аскомицетных дрожжей, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей генов *PGU*. Приводятся значения бутстрепа, превышающие 70%. Шкала соответствует 100 заменам на 1000 нуклеотидных остатков. Гены эндополигалактуроназы штаммов *E. gossypii* FDAG1 и ATCC10895 идентичны. У ряда штаммов в косых скобках указаны идентифицированные гены *PGU* в оригинальной классификации

Fig. 1. Phylogenetic tree of ascomycetous yeast based on analysis of nucleotide sequences of *PGU* genes. Bootstrap values exceeding 70% are given. Scale corresponds to 100 substitutions per 1000 nucleotides. Genes for endopolylgalacturonase of strains *E. gossypii* FDAG1 and ATCC10895 are identical. Numbers in slant brackets indicate the identified *PGU* genes of some strains in original classification

citri-aurantii, *Galactomyces candidus* и большое сходство некоторых *PGU* генов у следующих пар видов: *Galactomyces citi-aurentii* и *Geotrichum klebahnii*, *Galactomyces citi-aurentii* и *Galactomyces candidus*. Последнее свидетельствует о возможном межвидовом переносе генов *PGU* внутри р. *Galactomyces/Geotrichum*, как это уже было обнаружено нами среди видов р. *Saccharomyces*. Надо отметить, что дрожжи *Galactomyces* в основном отвечают генетической концепции рода [34, 35], согласно которой виды одного рода имеют общую систему типов спаривания, позволяющую им скрещиваться в любых межвидовых комбинациях

[36, 37]. Это, очевидно, может приводить к межвидовому переносу генов *PGU* в пределах р. *Galactomyces* и его анаморфных видов *Geotrichum*.

Пятый кластер представлен генами *PGU* (сходство 69–87,9%) различных видов недавно расширенного рода [1] *Eremothecium*: *E. cymbalariae*, *E. gossypii* и *Eremothecium* sp.

Результаты филогенетического анализа аминокислотных последовательностей пектиназ у изученных дрожжей-аскомицетов показаны на рис. 2; они хорошо соответствуют данным, полученным на основе нуклеотидных последовательностей генов *PGU* (см. рис. 1).

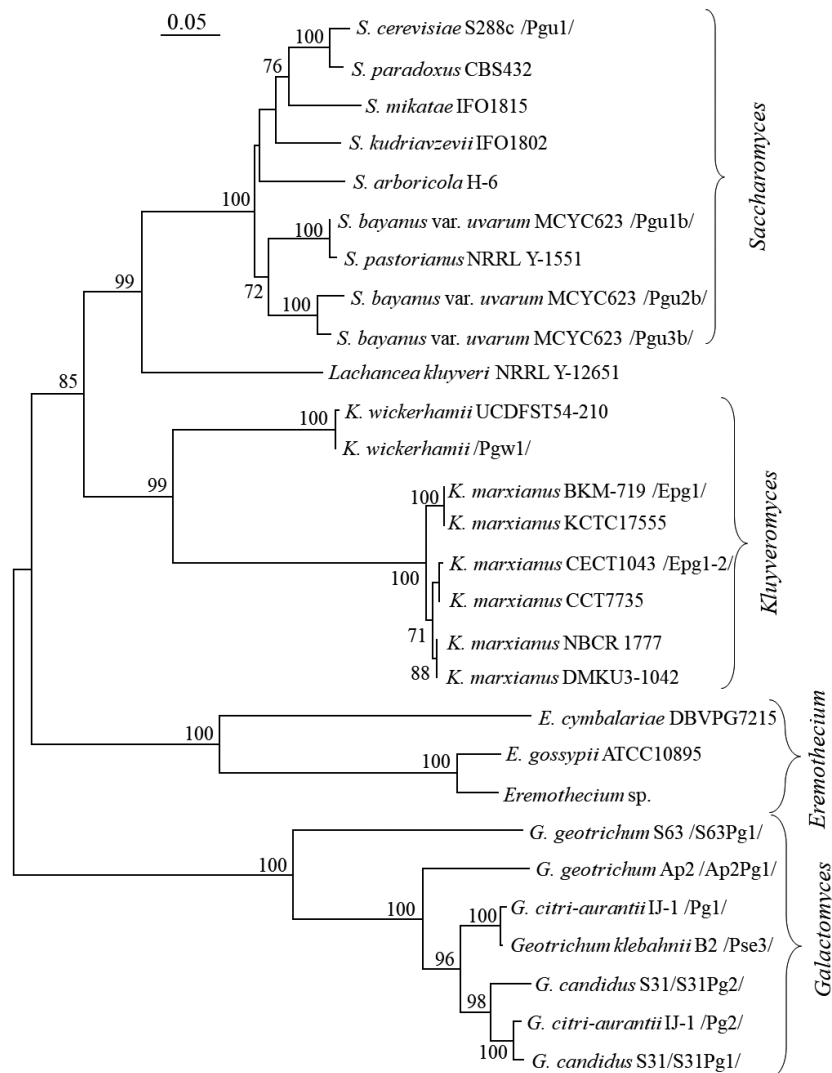


Рис. 2. Филогенетическое древо аскомицетных дрожжей, построенное на основе анализа аминокислотных последовательностей эндополигалактуроназ Pgu. Приводятся значения бутстрепа, превышающие 70%. Шкала соответствует 50 заменам на 1000 аминокислотных остатков. Эндополигалактуроназы штамма *E. gossypii* FDAG1 и ATCC10895 идентичны. У ряда штаммов в косых скобках указаны сокращенные названия различных эндополигалактуроназ Pgu.

Fig. 2. Phylogenetic tree of ascomycetous yeast based on analysis of amino acid sequences of their endopolygalacturonases Pgu. Bootstrap values exceeding 70% are given. Scale corresponds to 50 substitutions per 1000 amino acid residues. Endopolygalacturonases of *E. gossypii* strains FDAG1 and ATCC10895 are identical. Some strains have abbreviations for various endopolygalacturonases Pgu in slant brackets.

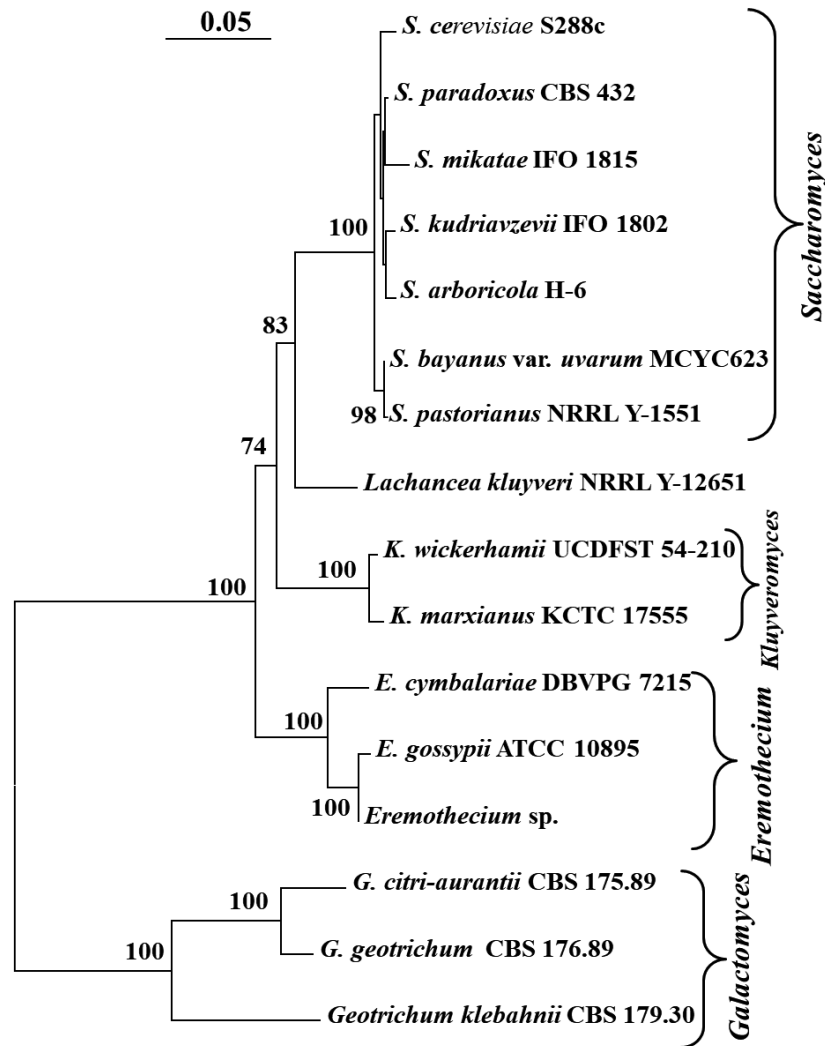


Рис. 3. Филогенетическое древо, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей участка D1/D2 большой рибосомной единицы 26S аскомицетных дрожжей. Приводятся значения бутстрепа, превышающие 70%. Шкала соответствует 50 заменам на 1000 нуклеотидных остатков. Штаммы, имеющие идентичные нуклеотидные последовательности D1/D2: 1) *S. bayanus* var. *uvarum* MCYC623, CBS 395; 2) *K. marxianus* KCTC 17555, NBRC 1777, ВКМ Y-719, СЕСТ 1043 и ССТ 7735

Fig. 3. Phylogenetic tree of ascomycetous yeast based on analysis of nucleotide sequences of D1/D2 domain of a large subunit (26S) of rRNA. Bootstrap values exceeding 70% are given. The scale corresponds to 50 substitutions per 1000 nucleotides. Strains with the identical D1/D2 nucleotide sequences: (1) *S. bayanus* var. *uvarum* MCYC623, CBS 395; (2) *K. marxianus*, KCTC 17555, NBRC 1777, ВКМ Y-719, СЕСТ 1043 and ССТ 7735

Выше мы уже отмечали таксономическую ценность генов *PGU*, по крайней мере, для определения родов дрожжей. Приведенное на рис. 3 эволюционное древо рибосомных последовательностей D1/D2 анализируемых дрожжей-аскомицетов хорошо согласуется с дивергенцией генов *PGU* у исследуемых штаммов. Для фенотипической идентификации дрожжей наряду с оценкой их способности к утилизации галактурановой кислоты имеет смысл использовать чашечный тест на наличие активной пектиназы, тем более, что он позволил бы проводить первичный отбор продуцентов этого фермента.

Второй аспект проведенного исследования (после установления таксономической ценности генов *PGU*) – значимость идентификации генов *PGU*. На наш взгляд, анализ пектиназных генов *PGU* также позволяет проводить первичный селекционный скрининг соответствующих продуцентов. Ранее было показано, что у мицелиальных грибов с высокой пектиназной активностью, например, *Aspergillus niger* [38] и *Sclerotinia sclerotiorum* [39], а также у дрожжей *G. citri-aurantii* [24], *G. geotrichum* [25] и *S. bayanus* var. *uvarum* [3] в геноме одного и того же штамма может присутствовать не один, а несколько полимерных

генов *PGU*. Обычно полимерные гены оказывают кумулятивный эффект, усиливая соответствующий признак. С другой стороны, наличие одного гена *PGU* у высокоактивных пектинолитических штаммов, например, *K. marxianus*, может свидетельствовать о том, что его сверхэкспрессия обеспечивается регуляторными механизмами, в частности, сильным промотором. Поиск подобных штаммов важен для генно-инженерных работ.

Таким образом, филогенетический анализ пектиназных генов представляет большой интерес для эволюционной генетики и селекции аскомицетных дрожжей.

Авторы выражают благодарность главному научному сотруднику ГосНИИгенетика Е.С. Наумовой за ценные рекомендации в процессе работы. Данное исследование было поддержано грантом РФФИ №17-04-00309.

ЛИТЕРАТУРА

- Kurtzman C.P., Fell J., Boekhout T. (Eds.). The Yeast. A taxonomic study. 5th ed. Amsterdam: Elsevier. 2011. 1–2080.
- Jayani R.S., Saxena S., Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem.*, 2005, 40, 2931–2944. doi: 10.1016/j.procbio.2005.03.026
- Наумов Г.И., Шаламитский М.Ю., Мартыненко Н.Н., Наумова Е.С. Молекулярная филогения пектиназных генов *PGU* дрожжей рода *Saccharomyces*. *Микробиология*, 2016, 85(6), 703–712. doi: 10.7868/S0026365616060173
- Luh B.S., Phaff H.J. Properties of yeast polygalacturonase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, 48, 23–37.
- Demain A.L., Phaff H.J., The preparation of tetragalacturonic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, 51, 114–121.
- Phaff H.J., Demain A.L. The unienzymatic nature of yeast polygalacturonase. *J. Biol. Chem.*, 1956, 218, 875–884.
- Luh B.S., Phaff H.J. Studies on polygalacturonase of certain yeasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1951, 33, 212–227.
- da Silva E. G., Borges M. de F., Medina C., et al. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Res.*, 2005, 5, 859–865. doi: 10.1016/j.femsyr.2005.02.006
- Masoud W., Jespersen L. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, 110, 291–296. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.030
- Мосиашвили Г.И., Патарая М.С. Пектинолитическая активность дрожжей. *Микробиология*, 1969, 38(3), 447–450.
- Котомина Е.Н., Писарницкий А.Ф. Пектинрасщепляющие ферменты некоторых видов *Saccharomyces*. *Прикл. биохим. микроб.*, 1974, 10(4), 623–626.
- Wang S. A., Bai F. Y. *Saccharomyces arboricolus* sp.nov., a yeast species from tree bark. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2008, 58, 510–514. doi: 10.1099/ijs.0.65331-0
- Kellis M., Patterson N., Endrizzi M., et al. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature*, 2003, 423(6937), 241–254. doi: 10.1038/nature01644
- Nguyen H. V., Legras J.L., Neuvèglise C., Gaillardin C. Deciphering the hybridisation history leading to the Lager lineage based on the mosaic genomes of *Saccharomyces bayanus* strains NBRC1948 and CBS380. *PLoS ONE*. 2011, 6(10), e25821. doi: 10.1371/journal.pone.0025821
- Galibert F., Alexandraki D., Baur A., et al. Complete nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X. *EMBO J.*, 1996, 15(9), 2031–2049.
- Cliften P., Sudarsanam P., Desikan A., et al. Finding functional features in *Saccharomyces* genome by phylogenetic footprinting. *Science*, 2003, 301(5629), 71–76. doi: 10.1126/science.1084337.
- Inokuma K., Ishii J., Hara K.Y., et al. Complete genome sequence of *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777, a nonconventional thermotolerant yeast. *Genome Announc.*, 2015, 3(2). Available at: <http://genomea.asm.org/content/3/2/e00389-15.full/>. doi: 10.1128/genomeA.00389-15
- Jeong H., Lee D.H., Kim S.H., et al. Genome sequence of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* KCTC 17555. *Eukaryot Cell*, 2012, 12, 1584–1585. doi: 10.1128/EC.00260-12
- Lertwattanasakul N., Kosaka T., Hosoyama A., et al. Genetic basis of the highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses. *Biotechnol. Biofuels*, 2015, 8, 47. doi: 10.1186/s13068-015-0227-x
- Silveira W.B., Diniz R.H., Cerdán M.E., et al. Genomic sequence of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 (UFV-3), a highly lactose-fermenting yeast isolated from the Brazilian dairy industry // *Genome Announc.*, 2014, 2(6). doi: 10.1128/genomeA.01136-14
- Sieiro C., Sestelo A.B., Villa T.G. Cloning, characterization, and functional analysis of the *EPG1-2* gene: a new allele coding for an endopolygalacturonase in *Kluyveromyces marxianus*. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57(19), 8921–8926. doi: 10.1021/jf900352q
- Šiekštelė R., Bartkevičiūtė D., Sasnauskas K. Cloning, targeted disruption and heterologous expression of the *Kluyveromyces marxianus* endopolygalacturonase gene (*EPG1*). *Yeast*, 1999, 15(4), 311–322.
- Baker C.R., Tuch B.B., Johnson A.D. Extensive DNA-binding specificity divergence of a conserved transcription regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, 108(18), 7493–7498. doi: 10.1073/pnas.1019177108

24. Cho I.J., Yeo I.C., Lee N.K., et al. Heterologous expression of polygalacturonase genes isolated from *Galactomyces citri-aurantii* IJ-1 in *Pichia pastoris*. *J. Microbiol.*, 2012, 50(2), 332–340. doi: 10.1007/s12275-012-1290-7
25. Nakamura M., Suprapta D.N., Iwai H., Arai K. Comparison of endo-polygalacturonase activities of citrus and non-citrus races of *Geotrichum candidum*, and cloning and expression of the corresponding genes. *Mol. Plant. Pathol.*, 2001, 2(5), 265–274. doi: 10.1046/j.1464-6722.2001.00075.x
26. Nakamura M., Iwai H., Arai K. Cloning and characterization of a polygalacturonase gene Ap2pgl from *Geotrichum candidum* citrus race Ap2 pathogenic to apple fruit. *J. Gen. Plant. Pathol.* 2002, 68, 333–337. doi: 10.1007/PL00013099
27. Iguchi K., Hirano H., Kishida M., et al. Cloning of a protopectinase gene of *Trichosporon penicillatum* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 1997, 143(5), 1657–1664. doi: 10.1099/00221287-143-5-1657
28. Dietrich F.S., Voegeli S., Brachat S., et al. The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Science*, 2004, 304(5668), 307–307. doi: 10.1126/science.1095781
29. Dietrich F., Voegeli S., Kuo S., Philippsen P. Genomes of *Ashbya* fungi isolated from insects reveal four mating-type loci, numerous translocations, lack of transposons, and distinct gene duplications. *Genes. Genomes. Genetics*, 2013, 1225–1239. doi: 10.1534/g3.112.002881
30. Wendland J., Walther A. Genome evolution in the *Eremothecium* clade of the *Saccharomyces* complex revealed by comparative genomics. *G3 (Bethesda)*, 2011, 1(7), 539–548. doi: 10.1534/g3.111.001032
31. Tamura K., Peterson D., Stecher G., et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 2013, 30, 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
32. Наумов Г.И., Шаламитский М.Ю., Наумова Е.С. Новое семейство пектиназных генов *PGU1b–PGU3b* у пектинолитических дрожжей *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. *ДАН*, 2016, 467(1), 109–111. doi: 10.7868/S0869565216070276
33. Шаламитский М.Ю., Наумов Г.И. Полиморфизм пектиназных генов *PGU* в комплексе *Saccharomyces bayanus*. *Генетика*, 2016, 52(5), 611–615. doi: 10.7868/S0016675816050106
34. Наумов Г.И., Смит М.Т., де Хоог Г.С. Генетическая интерпретация видообразования и жизненного цикла грибов *Galactomyces*. *Микробиология*, 1999, 68(3), 418–420.
35. Naumova E.S., Smith M. Th., Boekhout T., et al. Molecular differentiation of sibling species in the *Galactomyces geotrichum* complex. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2001, 80, 263–273. doi: 10.1023/A:1013038610122
36. Наумов Г.И. Генетическая концепция рода у грибов. *ДАН СССР*, 1978, 241(4), 952–954.
37. Наумов Г.И. Род как генетическая система. Проблемы микроэволюции: Сб. статей. М.: Наука. 1988, 112–113.
38. Bussink H.J., Buxton F.P., Fraaye B.A., et al. The polygalacturonase of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes. *Eur. J. Biochem*, 1992, 208, 83–90.
39. Fraissinet-Tacher L., Reymond-Cotton P., Fevre M. Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Curr. Genet.*, 1995, 29, 96–99.

Phylogenetic Analysis of Pectinases of Ascomycetous Yeasts

M.Yu. SHALAMITSKII^{1,2}, G.I. NAUMOV^{2,*}

¹The All-Russian National Research Institute for Viticulture and Winemaking Magarach, Russian Academy of Sciences, 298600, Yalta

²The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Centre «Kurchatov Institute» (NRC «Kurchatov Institute» – GosNIIGenetika), 117545, Moscow Russia

e-mail: gnaumov@yahoo.com*

Received August 28, 2017

Accepted October 03, 2017

Abstract—A screening of *PGU* genes of ascomycetous yeasts deposited in the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) and Sanger Institute databases (<http://www.sanger.ac.uk>) has been performed using the nucleotide sequence of the *PGUI* gene of *S. cerevisiae* S288c as a query. Divergent pectinase genes were found out in the *Eremothecium*, *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces* and *Lachancea* genera. Within the genera, the following similarity of the *PGU* nucleotide sequences was observed: 64,5–98,2% for *Kluyveromyces*, 72,7–81,3% for *Galactomyces/Geotrichum*, and 69–87,9% for *Eremothecium*. Polymeric *PGU* genes capable of interspecies transferring were documented in *Galactomyces citri-aurantii*, *Galactomyces candidus* and *Geotrichum klebahnii*. The importance of the *PGU* genes for the diagnosis and selection of yeasts is discussed.

Key words: pectine, endopolygalacturonase, yeast pectinase, *PGU* gene, *Eremothecium*, *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Lachancea*.

Acknowledgements—The authors are acknowledged to E.S. Naumova, Chief Researcher of GosNIIGenetika, for valuable recommendations. This study was supported by the Russian Fund for Basic Research (Grant 17-04-00309).

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-28-36