

УДК 575.174:577.152.321:579.25:582.282.232

Молекулярный полиморфизм пектиназных генов *PGU* дрожжей *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*

© 2019 Е.С. НАУМОВА^{1,*}, М.Ю. ШАЛАМИТСКИЙ², Г.И. НАУМОВ¹

¹ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский Институт» (НИЦ «Курчатовский Институт» – ГосНИИгенетика), Москва, 117545

²ФГБУН Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» Российской академии наук, Ялта, 298600

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Поступила в редакцию 17.12.2018 г.

После доработки 17.01.2019 г.

Принята к публикации 15.03.2019 г.

Проведен молекулярно-генетический анализ пектиназных генов *PGU* у 74 штаммов дрожжей *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, выделенных из различных ферментационных процессов и природных источников в разных регионах Европы и в США. В отличие от штаммов *S. cerevisiae*, имеющих по одному гену *PGU*, дрожжи *S. bayanus* var. *uvarum* обладают тремя дивергентными генами *PGU1b*, *PGU2b* и *PGU3b*, расположенными, соответственно, в хромосомах X, I и XIV. Высокая пектинолитическая активность этих дрожжей, по-видимому, связана с наличием в их геноме нескольких полимерных генов *PGU*.

Ключевые слова: *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, эндо-полигалактуроназа, пектиназа, гены *PGU1b*, *PGU2b* и *PGU3b*, молекулярное кариотипирование, Саузерн-гибридизация.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-2-30-37

Генофонд винных дрожжей *Saccharomyces* представлен двумя биологическими видами: *S. cerevisiae* и *S. bayanus* (син. *S. uvarum*) [1, 2]. Вид *S. bayanus* гетерогенен и включает две частично-генетически изолированные разновидности: *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. bayanus* var. *uvarum* [3]. Специфической экологической нишей последних дрожжей является виноделие и виноградарство при пониженных температурах [1, 4]. Дрожжи *S. bayanus* var. *uvarum* по ряду биохимических признаков существенно отличаются от винных штаммов *S. cerevisiae* [5–9]. В Европе дрожжи *S. bayanus* var. *uvarum*, как правило, ассоциированы с производством белых, сладких и игристых вин, а также сидра [10–17]. Редкие природные изоляты этого вида обнаружены в Испании, Словакии, Венгрии, на Дальнем Востоке России, в США и Аргентине [2, 18].

Пектиназа (эндо-полигалактуроназа, К.Ф.3.2.1.15) является одним из основных ферментов, осуществляющих расщепление высокомолекулярных пектиновых веществ растительного происхождения.

Пектин представляет собой полисахарид, состоящий из соединенных между собой $\alpha(1-4)$ -гликозидной связью остатков, в той или иной степени метилированной, галактуроновой кислоты, присутствующих в виде метилового эфира. Фермент пектиназа имеет большое значение в виноделии и применяется для осветления виноградного сусле и вина [19]]. Следует отметить, что пектинолитическая активность не характерна для дрожжей *S. cerevisiae* [20–23]. Отсутствие пектинолитической активности может быть связано с полным отсутствием пектиназного гена, а также мутациями в структурном гене *PGU* (псевдогены) или в регуляторных генах. Активный ген *PGU* обнаружен у французского шампанского штамма SCPP [24, 25], который на основании гибридологического и кариотипического анализов был ранее идентифицирован как *S. bayanus* var. *uvarum* [13]. Наряду с эндо-полигалактуроназой указанный штамм обладает еще двумя активными пектинолитическими ферментами: пектин-эстеразой и пектин-лиазой [24].

Цель настоящей работы – изучение молекулярно-генетических особенностей и хромосомное картирование полимерных пектиназных генов *PGU* винных дрожжей *S. bayanus* var. *uvatum*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Происхождение изученных штаммов дрожжей *S. bayanus* var. *uvatum* приведено в табл. 1 Дрожжи культивировали при 28 °С на полной питательной среде YPD, г/л: дрожжевой экстракт – 5, пептон – 10, глюкоза – 20, агар – 20. Для приготовления нативной хромосомной ДНК дрожжи выращивали в 10 мл жидкой YP-среды при 28 °С в течение 12–16 ч.

Пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК (молекулярное кариотипирование) и Саузерн-гибридизация

Выделение хромосомной ДНК проводили, как было описано ранее [11]. Для разделения хромосомной ДНК использовали аппарат CHEF-DR III («Bio-Rad», США). Образцы помещали в щели 1%-ного агарозного геля. Пульс-электрофорез проводили при 200 В в течение 15 ч при времени переключения полей 60 с и в течение 9 ч при времени переключения полей 90 с. В качестве буфера использовали 0,5×TBE, охлажденный до 14 °С. Штамм *Saccharomyces cerevisiae* YNN 295 (Bio-Rad), имеющий известный порядок и размеры

Таблица 1

Происхождение изучаемых штаммов дрожжей *Saccharomyces bayanus* var. *uvatum*

Origin of the *Saccharomyces bayanus* var. *uvatum* strains studied

Штамм	Номер CBS	Источник и место выделения
SRC274, SRC410	395	Сок черной смородины (Нидерланды)
BKM Y-1146	–	Яблочный сок, Нормандия (Франция)
M471, M472, M477, M478, M488, M489	8687	Виноград (Россия)
DBVPG 1642, DBVPG 1689, DBVPG 1690, DBVPG 1693	8689, 8690, 8691, 8692, 8693, 8694	Виноград (Молдавия)
Sμ1 = SG1.95	–	Виноград (Италия)
17e1	–	Ягоды винограда (Сансер, Долина Луары, Франция)
SCU11, SCU13, SCU197, SCU299, SCU374, SCU74, SCU397	–	Виноградный сок (Бордо, Франция)
L19, L99, L490	8711, 8712, 8713	Вино «Мюскаде» (Долина Луары, Нант, Франция)
PJP11.94, PJP12.94, PJP1.95	–	Вино (Тур, Долина Луары, Франция)
PJS1.94, PJS2.95, LC1.95, VS2.94	–	Бродящая мезга (Пуйи-Фюме, Долина Луары, Франция)
YПс2.93, ТВПб13.92, ТВVс2.95	–	Бродящая мезга (Сансер, Долина Луары, Франция)
DDI4.95	–	Бродящая мезга (Бордо, Сотерн, Франция)
D13	–	Бродящая мезга (Бордо, Барсак, Франция)
SCPP, SC4	–	Вино (Эльзас, Франция)
SRC55	–	Шампанское (Шампань, Франция)
SRC437	–	Бродящий яблочный сок (Бретань, Франция)
SRC258, SRC306	–	Сидр (Бретань, Франция)
SECT 12636, SECT 12638, SECT 12635	8717, 8718, 8716	Бродящий яблочный сок (Нормандия, Франция)
SECT 1369, SECT 1884, SECT 10560	–	Бродящий виноградный сок (Испания)
M300	–	Белое вино (Испания)
M369	8695	Красное вино (Ростов, Россия)
BKM Y-361, BKM Y-509, BKM Y-362, BKM Y-363, BKM Y-364, BKM Y-508	–	Вино (Словакия)
T4/1, T5/6, T13/30	–	Токайское вино (Словакия)
NCAIM Y.00676, NCAIM Y.00677	–	Токайское вино (Венгрия)
МСУС 623	7001	Алкогольный напиток (Венгрия)
		Ручейник <i>Mesophylax adopersus</i> (Испания)

Таблица 1. Продолжение

Штамм	Номер CBS	Источник и место выделения
CCY21-31-12	8698	<i>Amanita citrina</i> (Словакия)
UCDFST 51-206, UCDFST 61-137 136.01, 148.01	8697, 8696	<i>Drosophila persimiles</i> (США)
UCDFST 51-206	–	Сокотечения <i>Ulmus pumila</i> (Дальний Восток, Россия)
UCDFST 61-137	–	<i>Drosophila persimiles</i> , (США)
UWO (PS) 99-807.1.1, UWO (PS) 99-808.3	–	<i>D. pseudoobscura</i> (США)
	–	Сокотечение бука <i>Nothofagus</i> sp. (Патагония, Аргентина)

Примечание: Сокращенные названия коллекций: ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов, Пушкино, Россия; М – Коллекция микроорганизмов виноделия «Магарач» (КМВ «Магарач»), ФГБУН ВНИИВиВ «Магарач» РАН (Ялта, Россия); CBS – The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Утрехт, Нидерланды); CCY – Culture Collection of Yeasts, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences (Братислава, Словакия); CECT – Spanish Type Culture Collection, University of Valencia (Валенсия, Испания); DBVPG – Dipartimento di Biologia Vegetale Università di Perugia (Перуджа, Италия); L – Institut Technique de la Vigne et du Vin, Centre d'Experimentation de Tours (Париж, Франция); МСУС – Departamento de Microbiología, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid (Мадрид, Испания); NCAIM – National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (Будапешт, Венгрия); UWO (PS) – Culture collection of the Department of Biology, University of Western Ontario (Онтарио, Канада); UCDFST – Herman J. Phaff Yeast Culture Collection of the Department of Food Science and Technology, University of California (Дэвис, Калифорния, США); SCU – Institut Technique de la Vigne et du Vin, Centre d'Expérimentation de Nantes (Нант, Франция); SRC – The Yeast Collection of Station de Recherche Cidricoles (Ле-Рё, Франция); T4/1, T5/6, T13/30, 136.01, 148.01 – штаммы из коллекции лаборатории молекулярной генетики дрожжей ФГБУ «ГосНИИГенетика НИЦ «Курчатовский институт» (Москва, Россия); Все остальные штаммы из коллекции Institut des Sciences De la Vigne et du Vin (ISVV) (Вильнав-д'Орнон, Франция).

«–» – отсутствие коллекционного номера CBS.

Footnote: Acronyms for culture collections: VKM – All-Russian collection of microorganisms, Moscow; M – All-Russian National Institute for Vine and Winemaking “Magarach”, Yalta, Crimea, Russia; CBS – The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands; CCY – Culture Collection of Yeasts, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia; CECT – Spanish Type Culture Collection, University of Valencia, Valencia, Spain; DBVPG – Dipartimento di Biologia Vegetale Università di Perugia, Perugia, Italy; L – Institut Technique de la Vigne et du Vin, Centre d'Expérimentation de Tours, France; МСУС – Departamento de Microbiología, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Spain; NCAIM – National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapest, Hungary; UWO (PS) – Culture collection of the Department of Biology, University of Western Ontario, Ontario, Canada; UCDFST – Herman J. Phaff Yeast Culture Collection of the Department of Food Science and Technology, University of California, Davis, California, USA; SCU – Institut Technique de la Vigne et du Vin, Centre d'Expérimentation de Nantes, France; SRC – The Yeast Collection of Station de Recherche Cidricoles, Le Rheu, France; T4/1, T5/6, T13/30, 136.01, 148.01 are strains from the collection of the yeast molecular genetics laboratory of State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, NRC "Kurchatov Institute", Moscow, Russia. The remaining strains are from the collection of Institut des Sciences De la Vigne et du Vin (ISVV), Villenave d'Ornon, France.

«–» – no CBS collection number.

хромосом, служил кариотипическим стандартом. После электрофореза гель окрашивали бромистым этидием в течение 2–3 ч, затем промывали в дистиллированной воде в течение 2 ч и фотографировали в УФ-свете.

Хромосомную ДНК переносили на нитроцеллюлозную мембрану, используя аппарат Vacuum blotter («Bio-Rad»). ДНК фиксировали на мембране путем отжига при 80 °С в течение 2 ч. В качестве зонда использовали ПЦР-амплифицированный фрагмент, покрывающий большую часть кодирующей области гена *PGU1b* штамма *S. bayanus* var. *ivarum*. Метку вводили нерадиоактивным методом с использованием dUTP, меченого дигоксигенином (dig-II-dUTP) из набора DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I, согласно инструкции фирмы Roche (Швей-

цария). Гибридизацию и проявление гибридизационных полос так же проводили по инструкции указанной фирмы.

Секвенирование и филогенетический анализ

Дрожжевую ДНК выделяли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Литва). Для амплификации генов *PGU* использовали праймеры *PGU13* (5'-CCACCAAACGCAATGATTT-3') и *PGU14* (5'-ATGATGCACCTGAGCCAGAT-3'). ПЦР проводили в 30 мкл буфера, содержащего 2,5 мМ MgCl₂, 0,1 мМ каждого dNTP, 50 пмоль каждого праймера, 2,5 ед. Taq-полимеразы («Синтол», Россия) и 20–200 нг ДНК по следующей схеме: начальная денатурация ДНК при 94 °С в течение 4 мин, затем 35 циклов в режиме: денатурация при 94 °С – 60 с, отжиг праймеров при

55 °С – 60 с, синтез ДНК при 72 °С – 120 с; конечная достройка при 72 °С – 10 мин. Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 1%-ном агарозном геле при 60–65 В в 0,5×ТВЕ-буфере (45 мМ трис, 10 мМ ЭДТА, 45 мМ борная кислота, рН 8,0) в течение 2–3 ч. Гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция). В качестве маркера молекулярной длины ДНК использовали 1тпн DNA Ladder (Fermentas). Амплифицированные фрагменты генов *PGU* элюировали из геля с помощью набора DNA Extraction Kit (Fermentas) согласно протоколу фирмы изготовителя. Нуклеотидные последовательности определяли по двум цепям методом Сэнгера на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 (США). Полученные нуклеотидные последовательности анализировали при помощи программы SeqMan package (DNA Star Inc., США). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей генов *PGU* осуществляли вручную с использованием программы BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Филогенетические деревья строили методом ближайших соседей (Neighbor-Joining) в программе MEGA 6 [26].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью пульс-электрофореза хромосомных ДНК и последующей Саузерн-гибридизации с зондом *PGU1b* проведен крупномасштабный скрининг пектиназных генов дрожжей *S. bayanus* var. *ivarum* на материале 74 штаммов, выделенных из различных ферментационных процессов и природных источников в разных регионах мира (табл. 1). Молекулярные кариотипы некоторых штаммов представлены на рис. 1а. Идентификацию отдельных хромосомных полос проводили по кариотипу стандартного штамма *S. cerevisiae* YNN 295, имеющего известные размеры и порядок хромосом (рис. 1а, дорожка 1). В качестве генетического стандарта использовали генетическую линию *S. cerevisiae* S288С (дорожка 2), у которой первой из эукариотических организмов была определена полная нуклеотидная последовательность генома [27]. Этот штамм является международным ресурсом (*Saccharomyces* Genome Database, SGD <http://www.yeast-genome.org>) и используется в качестве референсного при изучении генов различных эукариотических организмов.

Дрожжи *S. cerevisiae* и *S. bayanus* var. *ivarum* можно легко отличить по молекулярным

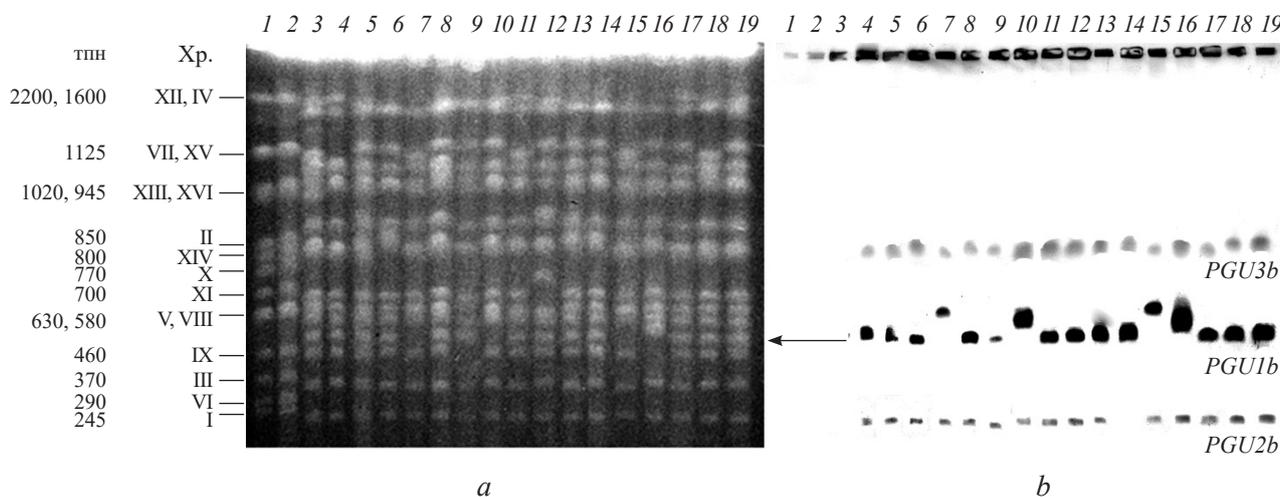


Рис. 1. Пульс-электрофорез (а) и Саузерн-гибридизация (б) хромосомной ДНК дрожжей *Saccharomyces bayanus* var. *ivarum* с зондом *PGU1b*. Дорожки: 3 – SССР; 4 – 17el; 5 – DBVPG 1642; 6 – YIIc2.93; 7 – СЕСТ 12636; 8 – ВКМ Y-1146; 9 – T13/30; 10 – NCAIM Y.00677; 11 – M300; 12 – ТВIIb13.92; 13 – DDI4.95; 14 – PJS1.94; 15 – PJS2.95; 16 – PJP1.95; 17 – SRC306; 18 – ССY21-31-12; 19 – МСYС 623. Контрольные штаммы *S. cerevisiae*: 1 – YNN 295; 2 – S288С. Слева указаны размеры и порядок хромосом стандартного штамма *S. cerevisiae* YNN 295. Стрелкой обозначена 4-я хромосома, в которой расположен ген *PGU1b*

Fig. 1. Pulsed-field gel electrophoresis (а) and Southern-hybridization of chromosomal DNA of the yeast *Saccharomyces bayanus* var. *ivarum* with the *PGU1b* probe. Lanes: 3 – SССР; 4 – 17el; 5 – DBVPG 1642; 6 – YIIc2.93; 7 – СЕСТ 12636; 8 – ВКМ Y-1146; 9 – T13/30; 10 – NCAIM Y.00677; 11 – M300; 12 – ТВIIb13.92; 13 – DDI4.95; 14 – PJS1.94; 15 – PJS2.95; 16 – PJP1.95; 17 – SRC306; 18 – ССY21-31-12; 19 – МСYС 623. Control strains of *S. cerevisiae*: 1 – YNN 295; 2 – S288С. The order and sizes of chromosomes refer to the chromosomes of the control strain YNN 295. The arrow shows the 4th chromosome, where the *PGU1b* gene is located

кариотипам [11]. Все 74 изученных штамма имели характерный для дрожжей *S. bayanus* var. *uvarum* кариотипический профиль с двумя хромосомными полосами размером 245–370 тпн (дорожки 3–19), вместо трех у *S. cerevisiae* (дорожки 1, 2). В то же время сравнительный анализ паттернов выявил полиморфизм размеров некоторых хромосомных полос. Наиболее существенно варьировали размеры хромосомных полос в диапазоне 460–800 тпн. Хромосомные ДНК большинства штаммов разделились на 12–14 электрофоретических полос. Согласно интенсивности свечения окрашенных полос, некоторые из них содержали более одной хромосомы. У большинства штаммов хромосомы размером около 800 тпн мигрировали в дуплете.

С помощью Саузерн-гибридизации было проведено хромосомное картирование генов *PGU* у изученных штаммов *S. bayanus* var. *uvarum*. В качестве зонда использовали ПЦР-амплифицированный ген *PGU1b* штамма МСУС 623. Геном этого штамма секвенирован [28]. Ранее у штамма МСУС 623 были идентифицированы три дивергентных гена: *PGU1b*, *PGU2b* и *PGU3b* [29–31].

На рис. 1b представлены результаты Саузерн-гибридизации изученных дрожжей *S. bayanus* var. *uvarum*. У 72 штаммов было обнаружено три гибридационных сигнала – начиная с низа геля хромосомы 1, 4 и дуплет хромосом 8/9. У винного штамма PJS1.94 были выявлены только две гибридационные полосы (рис. 1b, дорожка 14). Следует отметить слабую гибридацию зонда *PGU1b* с генами *PGU2b* и *PGU3b* и полное отсутствие гибридации с генами *PGU1* дрожжей *S. cerevisiae* YNN 295, S288C и геном *PGU4b* штамма *S. bayanus* var. *uvarum* SССР (рис. 1b, дорожки 1–3). Это обусловлено тем, что сходство нуклеотидной последовательности гена *PGU1b* с генами *PGU2b* и *PGU3b* составляет, соответственно, 86% и 87%, тогда как последние два гена идентичны на 96%. В то же время гены *PGU1b* (МСУС 623) и *PGU1* (S288C) имеют только 80% сходства, а ген *PGU4b* шампанского штамма SССР на 99,4% идентичен гену *PGU1* (рис. 2).

С помощью праймеров *PGU13* и *PGU14* из ДНК 12 штаммов различного происхождения CBS 395, DBVPG 1642, M300, ВКМ Y-1140,

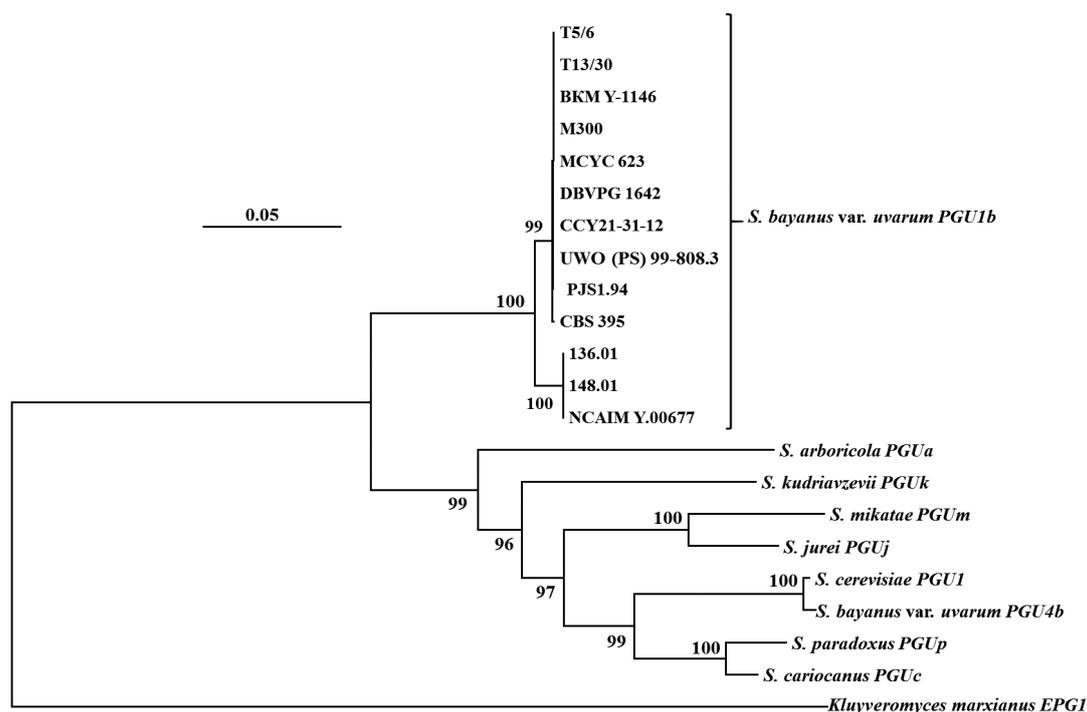


Рис. 2. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов *PGU* дрожжей *S. bayanus* var. *uvarum* и других видов рода *Saccharomyces*. В качестве внешней группы использовали ген *EPG1*, кодирующий эндо-полигалактуроназу дрожжей *Kluyveromyces marxianus*. Представлены значения бустрепа >70%. Шкала соответствует 50 заменам на 1 тпн

Fig. 2. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of the *PGU* genes of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* and other species of the genus *Saccharomyces*. The *EPG1* gene, encoding endo-polygalacturonase of the yeast *Kluyveromyces marxianus*, was used as an outgroup. Bootstrap values >70% are given. The scale corresponds to 50 substitutions per 1000 nucleotide positions

NCAIM Y.00677, T5/6, T13/30, PJS1.94, UWO (PS) 99-808.3, ССУ21-31-12, 136.01 и 148.01 (табл. 1) были амплифицированы фрагменты размером около 1100 пн, соответствующие гену *PGU1b*. Полученные нуклеотидные последовательности имели длину 1086 нуклеотидов, что покрывает большую часть кодирующей области гена *PGU1b*. Сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей выявил их большое сходство. Штаммы МСУС 623, DBVPG 1642, М300, ВКМ Y-1146, T5/6, T13/30, UWO (PS) 99-808.3, ССУ21-31-12 и PJS1.94 имели идентичные нуклеотидные последовательности генов *PGU1b*, которые были сходны с соответствующими нуклеотидными последовательностями штаммов NCAIM Y.00677, 136.01, 148.01 и CBS 395, соответственно, на 98,3% и 99,9%.

На основании анализа нуклеотидных последовательностей генов *PGU1b* дрожжей *S. bayanus* var. *ivarum* и имеющихся в базе Генбанка последовательностей генов *PGU* остальных семи видов рода *Saccharomyces* (*S. arboricola* CBS 10644, *S. cariocanus* UFRJ50816, *S. jurei* CBS 14759, *S. cerevisiae* S288C, *S. kudriavzevii* NBRC 1802, *S. mikatae* NBRC 1815 и *S. paradoxus* CBS 432) было построено филогенетическое древо (см. рис. 2). В качестве внешней группы использовали эндо-полигалактуроназный ген *EPGI* дрожжей *Kluveromyces marxianus*.

Все изученные пектиназные гены дрожжей *Saccharomyces* образовали отдельный кластер относительно внешней группы. Внутри этого кластера выделялись несколько четко обособленных субкластеров, как правило, согласно видовой принадлежности дрожжей (рис. 2). Наибольшее сходство имели пектиназные гены дрожжей *S. paradoxus PGUp* и *S. cariocanus PGUc* (96,8%), а также *S. mikatae PGUm* и *S. jurei PGUj* (92%). Сходство генов *PGU* остальных видов *Saccharomyces* было ниже 90%. Таким образом, филогенетический анализ выявил видоспецифичность пектиназных генов дрожжей *Saccharomyces*.

Интересно отметить, что у 73 штаммов *S. bayanus* var. *ivarum* сильные гибридизационные сигналы с зондом *PGU1b* отмечены в 4-й снизу хромосоме, которая по размеру соответствует хромосоме VI дрожжей *S. cerevisiae* YNN 295 (рис. 1, дорожки 4–19 и 1 соответственно). Дрожжи *S. bayanus* var. *ivarum* имеют видоспецифичный молекулярный кариотип благодаря наличию трех реципрокных транслокаций, одна из которых затрагивает хромосомы X и VI (согласно нумерации хромосом дрожжей *S. cerevisiae*) [32].

Известно, что ген *PGU1* у дрожжей *S. cerevisiae* расположен в теломерном районе хромосомы X (<http://www.yeastgenome.org>). Такую же хромосомную локализацию имеют гены *PGU* видов *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Проведенный в данной работе молекулярно-генетический анализ пектиназных генов показал, что независимо от источника и места выделения штаммы *S. bayanus* var. *ivarum*, как правило, имеют генотип *PGU1b PGU2b PGU3b*. Известно, что активная ферментация сахаров (мальтоза, сахароза, мелибиоза) и растительного крахмала, обусловлена наличием в геноме дрожжей *S. cerevisiae* полимерных генов *MAL*, *SUC*, *MEL* и *STA*, которые имеют кумулятивный эффект, усиливая соответствующий признак [33]. Принимая во внимание высокую пектинолитическую активность дрожжей *S. bayanus* var. *ivarum* [34, 35] и большое значение этих дрожжей для виноделия необходимо дальнейшее генетическое и селекционное изучение полимерных генов *PGU1b*, *PGU2b* и *PGU3b*.

Исследование выполнено по Госзаданию №595-00004-18ПР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Naumov G.I. Genetic basis for classification and identification of the ascomycetous yeasts. *Stud. Mycology*, 1987, 30, 469–475.
2. Наумов Г.И., Наумова Е.С., Мартыненко Н.Н., Маснёф-Помаред И. Таксономия, экология и генетика дрожжей *Saccharomyces bayanus* – нового объекта в науке и практике. *Микробиология*, 2011, 80(6), 723–730. doi: 10.1134/S0026261711060154
3. Наумов Г.И. Новая разновидность *S. bayanus* var. *ivarum*, установленная генетическим анализом. *Микробиология*, 2000, 69(2), 410–414.
4. Баштанная И.И. Расы дрожжей, пригодные для брожения виноградного сусла при низкой температуре. *Винодельческая промышленность*, 1969, 7, 10–14.
5. Арабидзе Г.В. Биохимические особенности дрожжей вида *Saccharomyces uvarum*. *Прикл. биохимия и микробиология*, 1968, 4(5), 603–606.
6. Giudici P., Zambonelli C., Passarelli P., Castellari L. Improvement of wine composition with cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1995, 46, 143–147.
7. Rainieri S., Zambonelli C., Tini V., Castellari L., Giudici P. The enological traits of thermotolerant *Saccharomyces* strains. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1998, 49, 319–324.

8. Masneuf-Pomarède I., Bely M., Marullo P., Lonvaud-Funel A., Dubourdieu D. Reassessment of phenotypic traits for *S. bayanus* var. *uvarum* wine yeast strains. *Int. J. Food Microbiol.*, 2010, 139, 79–86. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.038
9. Querol A., Pérez-Torrado R., Alonso-Del-Real J., Minebois R., Stribny J., Oliveira B.M., Barrio E. New Trends in the Uses of Yeasts in Oenology. *Adv. Food Nutr. Res.* 2018, 85, 177–210. doi: 10.1016/bs.afnr.2018.03.002
10. Le Jeune C., Lollier M., Demuyter C., Erny C., Legras J.-L., Aigle M., Masneuf-Pomarède I. Characterisation of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. *FEMS Yeast Res.*, 2007, 7, 540–549. doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00207.x
11. Naumov G.I., Naumova E.S., Gaillardin C. Genetic and karyotypic identification of wine *Saccharomyces bayanus* yeasts isolated in France and Italy. *Syst. Appl. Microbiol.*, 1993, 16, 274–279.
12. Naumov G.I., Masneuf I., Naumova E.S., Aigle M., Dubourdieu D. Association of *S. bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations. *Res. Microbiol.*, 2000, 151, 683–691. doi: 10.1016/S0923-2508(00)90131-1
13. Naumov G.I., Naumova E.S., Aigle M., Masneuf I., Belarbi A. Genetic reidentification of the pectinolytic yeast strain SCPP as *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 55, 108–111.
14. Naumov G.I., Nguyen H.-V., Naumova E.S., Michel A., Aigle M., Gaillardin C. Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider-fermenting yeast. *Int. J. Food. Microbiol.*, 2001, 65, 163–171. doi:10.1016/S0168-1605(00)00515-8
15. Naumov G.I., Naumova E.S., Antunovics A., Sipiczki M. *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* in Tokaj wine-making of Slovakia and Hungary. *Appl. Microbiol. Botechnol.*, 2002, 59(6), 727–730. doi: 10.1007/s00253-002-1077-6
16. Rementeria A., Rodriguez J.A., Cadaval A., Amenabar R., Mugaruza J.R., Hernando F.L., Sevilla M.J. Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from «Txakoli de Bizkaia» region (Basque Country, North Spain). *Ind. J. Food. Microbiol.*, 2003, 86, 201–207. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00289-7
17. Torriani S., Zapparoli G., Suzzi G. Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1999, 5, 207–215.
18. Libkind D., Hittinger C.T., Valério E., Gonçalves C., Dover J., Johnston M., Gonçalves P., Sampaio J.P. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, 108(35), 14539–14544. doi: 10.1073/pnas.1105430108
19. 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
20. Blanco P., Sieiro C., Reboredo N.M., Villa T.G. Genetic determination of polygalacturonase production in wild-type and laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, 1997, 167, 284–288.
21. Divol B., Rensburg P. PGU1 gene natural deletion is responsible for the absence of endo-polygalacturonase activity in some wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 2007, 7, 1328–1339. doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00284.x
22. Fernández-González M., Ubeda J.F., Vasudevan T.G. et al. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004, 237, 261–266. doi: 10.1016/j.femsle.2004.06.042
23. Louw C., Young P.R., Rensburg P., Divol B. Regulation of endo-polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 2010, 10, 44–57. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00584.x
24. Gainvors A., Frézier V., Lemaesquier H. et al. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast*, 1994, 10(10), 1311–1319. doi: 10.1002/yea.320101008
25. Gognies S., Gainvors A., Aigle M., Belarbi A. Cloning, sequence analysis and overexpression of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase-encoding gene (PGL1). *Yeast*, 1999, 15, 11–22. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(19990115)15:1<11::AID-YEA336>3.0.CO;2-O
26. 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
27. Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G. Life with 6000 genes. *Science*, 1996, 274, 546–567. doi: 10.1126/science.274.5287.546
28. Bon E., Neuvéglise C., Casaregola S., Artiguenave F., Wincker P., Aigle M., Durrens P. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 5. *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. *FEBS Lett.*, 2000, 487, 37–41. doi:10.1016/S0014-5793(00)02276-6
29. 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
30. Наумов Г.И., Шаламитский М.Ю., Наумова Е.С. Новое семейство пектииназных генов *PGU1b–PGU3b* у пектинолитических дрожжей *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. *ДАН*, 2016, 467(1), 109–111. doi: 10.7868/S0869565216070276
31. Шаламитский М.Ю., Наумов Г.И. Полиморфизм пектииназных генов *PGU* в комплексе *Saccharomyces bayanus*. *Генетика*, 2016, 52(5), 611–615. doi:10.7868/S0016675816050106

32. Fischer G., James S.A., Roberts I.N., Oliver S.G., Louis E.S. Chromosomal evolution in *Saccharomyces*. *Nature*, 2000, 405, 451–454.
33. Наумов Г.И. Естественное разнообразие дрожжей – неисчерпаемый генофонд для фундаментальных и прикладных разработок. *Успехи совр. биол.*, 1997, 117(2), 185–195.
34. Panon G., Massiot P., Drilleau J.-F. Production d'enzymes pectinolytiques par les levures d'intérêt cidricole. *Sciences des Aliments*, 1995, 15, 31–42.
35. Gainvors A., Karam N., Lequart C., Belarbi A. Use of *Saccharomyces cerevisiae* for the clarification of fruit juices. *Biotechnol. Lett.*, 1994, 16, 1329–1334.

Molecular Polymorphism of Pectinase Genes *PGU* of the Yeast *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*

E.S. NAUMOVA^{1,*}, M.Yu. SHALAMITSKIY², G.I. NAUMOV¹

¹State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center «Kurchatov Institute» (NRC «Kurchatov Institute» – GosNIIgenetika), 117545, Moscow Russia

²All-Russian National Institute for Vine and Winemaking «Magarach», Russian Academy of Sciences, Yalta, 298600, Russia

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Received December 17, 2018

Revised January 17, 2019

Accepted March 15, 2019

We have conducted a molecular genetic study of the pectinase *PGU* genes of 74 strains of the yeast *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, isolated from various fermentation processes and natural sources in different regions of Europe and in the USA. Unlike *S. cerevisiae*, each having a *PGU* gene, strains of *S. bayanus* var. *uvarum* have three divergent genes *PGU1b*, *PGU2b* and *PGU3b*, located respectively on chromosomes X, I and XIV. The high pectinolytic activity of these yeasts appears to be related to the presence of several *PGU* polymeric genes in their genome.

Key words: *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, endo-polygalacturonase, yeast pectinase, genes *PGU1b*, *PGU2b* and *PGU3b*, molecular karyotyping, Southern-hybridization

Funding—This study was supported by Budget-supported project No. 595-00004-18PR.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-2-30-37