На правах рукописи

Сухотина Наталия Николаевна

Геносистематика дрожжей рода *Kluyveromyces*

Специальность 03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2007

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики, таксономии и экологии дрожжей (зав. лабораторией, доктор биологических наук, профессор Г.И. Наумов) в ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ФГУП ГосНИИгенетика), г. Москва.

Научный руководитель:

доктор биологических наук Наумова Елена Сергеевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук Лившиц Виталий Аркадьевич

кандидат биологических наук Лысенко Анатолий Михайлович

Ведущая организация:
отдел эволюционной биохимии научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова.

Защита состоится « 6 » марта 2007 г. в 14^{00} на заседании Диссертационного совета Д217.013.01 при ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» по адресу: 117545, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, 1. Факс: (495) 315-05-01.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГУП ГосНИИгенетика.

Автореферат разослан « 5 » февраля 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук Заиграева Г.Г.

H ; S : Y O : J : D L ? J B K L B D ::; H L U

Актуальность проблемы. F h e h q g *Kluyveromyces* y \ e y x l k y h ^ g b f a h k g h \ g h u [d _ d l f h \ e _ d m e y] j g g h _ c l b d r b j h d b k i h e v a m \ x l k y [b h l _ o g h e d Z b d h ^ m p _ g y v Z b h e h] b q _ k d d b \ g \ _ o s _ k l K h a ^ Z g _ \ j h i _ c k d b e m [i h f h e _ d m e y j g b h c e h] b ^ j h ` ` _ c *Kluyveromyces*, _ ` _ ] h ^ g h i j h \ h ^ y s b c f _ ` ^ m g Z j h ^ g d h g n _ j _ g p b l b e g h p _ g g h _ b k i h e v a h \ Z v g l b _ o ^ j h ` ` _ c g _ \ h a f h ` g h a a g Z g b b y o n b a b h e h] h] _ g _ l b q _ k d k b o [_ g g h k b _ g Z m q g h [h k g h \ Z g g h e Z k k b n b d Z p b b b ^ _ g l b n b d Z p b b

K b k l _ f Z l b q _ i k e h ` _ g ^ j h ` ` _ c h ^ Z *Kluyveromyces* i h ^ \ _ j ] Z e h k v f g h ] h q b k e _ g g \ u f a b y i f _ j _ k f Z l j b \ Z b e d k j y h ^ h \ h k c l Z l . m k l _ j \ h g Z q Z e h v i d h k Z g g \ u j h ^ _ *Saccharomyces* (Lodder b Kreger-van-Rij, 1952), w l b ^ j h ` ` b \ d e x q Z e k h k l Z a e b q g b h ^ *Zygosaccharomyces*, *Fabospora, Zygofabospora* b ^ j l h k e _ h ] h d Z d van der Walt b a f _ g b e i _ j \ h g Z q Z e v ^ d u Z d g h a e b k i h j h \ h ] h Z *Kluyveromyces*, \ g _ ] h [ u e b \ d e x q _ g u _ f g h ] h k i h j h ^ j b ` ` b *Saccharomyces marxianus* b j h ^ k l \ _ g g u _ \ b ^ u (van der Walt, 1965). = _ g _ l b q _ k Z d h Z e b b a k _ d \ _ g b j h \ Z g b _ j b [h k h f Z e v] g _ u g h \ \ u y \ b e i h e b n b e p h x ^ Z *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt (G Z m f h 1986, 1987; Cai et al., 1996; Kurtzman, Robnett, 1998). < g m l j w b l h] h _ l _ j h] _ g g h ^] Z [u e Z u ^ _ e _ g Z n i j Z \ d e x q Z x s Z y] b [j b ^ b a b j m \ _ b f ^ u u *K. lactis, K. marxianus, K. dobzhanskii* b *K. wickerhamii)* b l Z d k h g h f b q [_ k b a d ^ b j h ` ` b *K. aestuarii* b *K. nonfermentas*. G Z h k g h \ Z g b b f m e v l b] _ g g n h b] e h h] _ g _ l b q _ Z k g d Z h e] b [a u Z e Z i j h \ _ ^ _ g j Z \ b a b d y e Z ^ Z Saccharomyces b d h g k _ j \ Z j p h ^ Y *Kluyveromyces*, \ d h l h j h [f u e b h k l Z \ e _ g u l h e v d h _ k l w m d Z a Z g j b ^ b (Kurtzman, 2003). < w l h k h k l Z *Kluyveromyces* n Z d l b q _ y k d e b y _ l i k _ y j _ b f _ g h \ Z g j h b ^ Z *Zygofabospora* Kudriavzev emend. G. Naumov 2002.

> e y k h a ^ Z g b Z m q g h e Z k k b n b d Z j p h ` b _ \ u o h j] Z g b a f h b \ i h e m q _ g ^ h y k l h \ _ j g k u \ o _ ^ _ g h c b o w \ h e x p l g b _ h [o h ^ b i f h m f b f h n _ g h l b i b q _ k i d h b a g Z d] b _ g h l b . i h \ l h k e _ ^ g b y \ e y x l k y i j _ ^ f _ l h f b a m q _ g h] y g h k b k l _ f Z l b d e b b f Z d j h f h e _ d m e k y b j k g l h _ c f Z l (b : g l b h g , h 1967, 2005). G _ ^ Z \ i g j h \ _ ^ _ g g h _ k _ d \ _ g b j h \ Z _ g g b h _ f Z j h ` ` _ c *K. lactis* (Bussereau et al., 2006) a Z e h ` b e h o h j h r m h x k g h \ m e y b a m q _ ^ g j b m y] l b \ b ^ h w l h] j h m ^ . Z H ^ g Z d l h e _ d m e y j g u _ b k k e _ ^ h \ Z j g b h y ^ y l g k Z h] j Z g b q _ g d g h e f b q _ k l Z _ f f h K *Kluyveromyces*, \ h k g h \ g h g f Z l b i h \ u o d m e v l m j b Z o] _ g _ l b q _ k e b b g b y b ^ g h] h i j h b k o h ` ^ . g l b Z y d b f h [ j Z a , h f b a m q Z _ l l k e y v d h ] j Z g b q _ g g g Z k y l v ] _ g h n h g w Z b o ^ j h ` ` _ , c Z b o i j b j h ^ g h j Z a g h h [j Z a k l Z _ l k g y _ b k k e _ ^ h \ Z g j g Z u d f l b q _ g b b q _ g h b a \ _ k l h g i h i m e y p b - h] g g h l b q _ k d b o

h k h [_ g g h k l Z ỳ g u ô e y g Z m d b b j Z d l b d d b m e v l b \ b j m ^ _ j f u ` ô _ c j h ^ Z
Kluyveromyces b b o ^ b d b j o h ^ k l \ _ g g . b d h \

Цель и задачи исследования. P _ e v x g Z k l h y s _ c j Z [h l u y \ e y _ l k y a m q _ g b _ f h e _ d m e y j g h -] _ g _ l b q _ k d h] h f g h] h h [j Z a b y , d Z d k h g h \ u ^ e y x p b o b m e v l m j ^ j h ` ` _ c j h ^ Z *Kluyveromyces* g Z f Z l _ j b Z e Z o f h \ j Z a e b q g h] h [h e h] b q _ k d h] h b] _ h] j Z n b q _ k d h] h b k o h ` ^ _ g b y k \ y a b j Z [h l _ r Z e b k v k e _ ^ m x s b _ a Z ^ Z q b

1. J Z a j Z [h l Z l v k i j _ f k l k h ^ Z f h e _ d m e y j g h] h b ^ _ g l b n b d Z p b b ^ j h ` ` _ c j h ^ Z *Kluyveromyces* b f h e _ d m e y j g h] h n b] j h \ Z g b y ^ _ e v g u o r l Z f f h \
2. K j Z \ g _ g b _] _ g h f h \ b ^ h \ j h ^ Z *Kluyveromyces.*
3. B a m q _ g b _] _ g _ l b q _ k d h] h b f h] h h [j Z a b y ^ j h ` ` _ c *K. lactis, K. marxianus* b b o ^ b d b j o h ^ k l \ _ g g . b d h \
4. K j Z \ g b l _ e v g Z y o Z j Z d l _ j b k l b d Z] _ g h f h \ h e h q g u o d e b g b q _ k d b o r l Z f f h \ *Kluyveromyces.*
5. F h e _ d m e y j g Z y b ^ _ g l b n b d Z p b y j _ ^ d b o ^ j h ` ` _ c *K. dobzhanskii* b *K. wickerhamii.*

Научная новизна и практическая значимость. G Z f Z l _ j b Z e Z o f h \ j Z a e b q g h] h i j h b k o h ` ^ _ g b y \ i _ j \ u _ i j h \ _ ^ _ g h b a m q _ g b _ ] _ g _ l b q _ k d h ] h j Z a g h h [ j Z a b y ^ j h ` ` _ c j h ^ Z *Kluyveromyces.* G Z h k g h \ Z g b b e b m q _ g b y ^ Z g g u o j Z a j Z [ h l Z g Z k i j _ f k l k h ^ f h e _ d m e y j g h ] h n b g _ j i j b g l b g ] Z ^ j h ` ` _ c i h f h s v x i j _ k l j b d l Z a g h ] h ] Z e b a Z ] _ g h f Z (GS2) j > G D > e y l b i b j h \ Z g b y ^ _ e v g u o r l Z f f h \ i j _ ^ e h ` _ g h b k i h e v a h \ Z l v P L J k g Z e b k Z ij Z c f _ j Z f b (TG)$_5$, (GTG)$_5$, b OPA-11. K i h f h s v x i m e v k -]_ e v - w e _ d l j h n h j _ a Z b g l Z d l g u o o j h f h k h f g u o > G D i h e m q _ g b ^ Z g g u _ h j f Z p b b \ b ^ h \ u o k h [_ g g h k l y o] _ g h f h \ ^ j h ` ` _ c *Kluyveromyces.* M k l Z g h \ e _ g h , q l h \ b ^ u *K. marxianus, K. dobzhanskii* b *K. wickerhamii* b f _ x l h ^ b g Z d h \ u c k Z j b h l b i o j h f h k h f jZ \ g h \ _ k v f b *K. lactis* – j Z \ g h r _ k l b . b l j _ ^ _ e v g u Z f _ j Z o j h f h k h f g u o i h e h k k m s _ k l \ _ g g h Z e b q Z x l k y l u j _ \ b ^ h \

< u y \ e _ g u ^ h k l Z l h q g h b a _ k l \ m x s b _ j Z k k b n b d Z p b b b b _ *K. lactis,* Z b f _ g g h _ i j Z \ b e v g h j Z a ^ _ e _ g b _ \ _ j Z a g h \ b ^ g h k l b *K. lactis* var. *lactis* b *K. lactis* var. *drosophilarum.* H [g Z j m ` _ g h , q l h ] _ g h f k l Z g ^ Z j l g h \ b ^ g h k l b *K. lactis* var. *drosophilarum,* m d h l h j h c b n n _ j _ g p b j h \ Z g h e v ] _ g _ l b q _ k d b o i h i m e y p b c d Z a Z , q l h \ b ^ *K. marxianus* l Z d ` _ y \ e y _ l k y f h] _ g g u f \ d e x q Z _ l l j b ^ b \ _ j] _ g l g u o i m e y p b c : 1) b k o h [k l \ _ g g h "marxianus" – i j b j h ^ g u _ d h k f h i h e b l g u _ ^ j h ` ` b ; 2) "fragilis" – f h e h q g u _ l Z d ` _ d h k f h i h e b l g u _ ^ j h ` ` b ; 3) "wikenii" – w g ^ _ f b q g u _ ^ j h ` ` b b a Z e d h ] h e v g u o j _ b _ g l Z p b h g g u o i j h p _ k k h \ . X ` g h c : n j b d _ < i _ j \ u _ m k l Z g h \ e _ g h q l h i h f g h] b f f h e _ d m e y j g u f i j b a g Z d Z f e b g b q _ k d b _ r l Z f f u *K. lactis* b *K. marxianus* g _ h l e b q Z x l k y l Z f f h \ w l b o \ b ^ h \ , \ u ^ _ e _ g g u o a h e h q g u o i j h ^ m d l h \ h q _ \ b ^ g h b k o h ^ y l b o

< i _ j \ u _ i j h \ _ ^ _ g h a m q _ g b i _ i m e y p b h g g h l j m d l m j u b j h ^ g u o ^ j h ` ` _ c *K. dobzhanskii.* I h d Z a Z g h q l h w l h l \ b ^ \ d e x q Z _ l d j Z c g _ f _ c j, _ l j b] _ h] j Z n b q _ k d b _ i m e y p b b (_ \ j h i _ c k, d m x k _ \ _ j h Z f _ j b d Z g k d m x ^ Z e v g _ \ h k l h q g m x)

K h a ^ Z g b _ [Z e v r Z y h e e _ d p b y j Z d l _ j b a h \ Z g g u o r l Z f f h \ *K. lactis, K. marxianus, K. dobzhanskii* b *K. wickerhamii*, d h l h j u _ f h] m l [u l v b k i h e v a h \ Z g u m g ^ Z f _ g l Z e v g u o b k k e _ ^ h \ Z g b y o b d e Z ^ g u o j Z a j Z [h l d Z o

Место проведения работы. H l ^ _ e v g u _ d k i _ j b f _ g l u [u e b i h e g _ g u \ e Z [h j Z l h j b b] _ g _ l b d b ` _ \ b g k l b l m l _ Z ] j h o b f b b b s _ \ u o j h ^ m d l h \ < Z e _ g k b y i Z g b y b i h ^ ^ _ j ` d _ g b y ? \ j h i _ c k d h f] h d j h [b h e h] b q _ k d h] h l \ Z e y f h e h ^ u o m q _ g u o Z k i b j Z g l h \ (FEMS FELLOWSHIP 2004-1).

Апробация работы и публикации. H k g h \ g u _ j _ a m e v l Z l u [u e b i j _ ^ k l Z \ e _ g u g Z f _ ` ^ m g Z j h ^ g h f d h g ] j _ k k _ i h i _ j k i _ d l b \ g u f i j h [ e _ f Z f [ b h e h ] b b (2003, E x [ e y g Z, K e h \ _ g b y), 2-f F _ ` ^ m g Z j h ^ g h f d h g] j _ k k _ i h l _ o g h e h] b y f k h k l h y g b _ i _ j k i _ d l b \ u j Z a \ b l b y (2003, F h k d \ Z), 2-f, 3-f, 4-f < k _ j h k k b c k d h f d h g] j _ k k _ F _ ^ b p b g k d h c f b d j h [b h e h] b b (F h k d \ Z, 2004, 2005, 2006) b g Z 22-c F _ ` ^ m g Z j h ^ g h c d h g n _ j _ g p b b = b h g _ l b d b F h e _ d m e y j g h c ; b h e h ] b b > j h ` ` _ c (2005, ; j Z l b k e Z \ Z, K e h \ Z d b y) > b k k _ j l Z p b h g g Z y j Z [ h l Z [ u e Z i j h [ b j h \ Z g Z g Z k _ ^ Z g b b f _ ` e Z [h j Z l h j g h] h k _ f b g Z j Z = h k G B B] _ g _ l b d Z 19 b x g y 2006] h ^ Z

I h l _ f _ ^ b k k _ j l Z p b b h i m [e b d h \ Z g h 3 k l Z l v b b 6 l _ a b k h \

Структура и объем диссертации. > b k k _ j l Z p b y k h k l h b l b a \ \ _ ^ _ g b y, h [a h j Z e b l _ j Z l m j u, h i b k Z g b y f Z l _ j b Z e h \ b f _ l h ^ h \, j _ a m e v l Z l h \ b h [k m ` ^ _ g b y, a Z d e x q _ g b y b \ u \ h ^ h \ F Z l _ j b Z e u ^ b k k _ j l Z p b b b a e h ` _ g u g Z 153 k l j Z g b p Z o f Z r b g h i b k g h] h l _ d k l Z, \ d e x q Z y 38 l Z [e b p b 14 j b k m g d h \ K i b k h d p b l b j m _ f h c e b l _ j Z l m j u \ d e x q Z _ l 188 b k l h q g b d h \

F : L ? J B : E U B F ? L H > U B K K E ? > H < : G B Y

Объекты исследования. < j Z [h l _ b k i h e v a h \ Z g h 169 r l Z f f h \ *Kluyveromyces* j Z a e b q g h] h i j h b k o h ` ^ _ g b y, i h e m q _ g g u o b a k e _ ^ m x s b o d h e e _ d p b c ATTC – American Type Culture Collection, J h d \ b e e, K R :; < D F – < k _ j h k k b c k d Z y d h e e _ d p b y f b d j h h j] Z g b a f h \, F h k d \ Z; CBS – Centraalbureau voor Schimmelcultures, M l j _ o l, = h e e Z g ^ b y; CECT – Spanish Type Culture Collection, University of Valencia, < Z e _ g k b y, B k i Z g b y; NCYC – National Collection of Yeast Cultures, G h j b ^ \ b q, = e Z g ^ b y; NRRL – Northern Region Research Center, I _ h j b y, B e e b g h c k, K R :; S – W.T. Starmer, Department of Biology, Syracuse University, K b j Z d m a, K R :; SM – J.P. Schmidt, Institut National Agronomique, I Z j b ` = j b g v h g, N j Z g p b y; UCD-FST – Herman J. Phaff Yeast

Culture Collection of the Department of Food Science and Technology, University of California, Дэвис, США; UCM – Украинская коллекция микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии НАН, Киев, Украина; UWO(PS) – Culture collection of the Departament of Biology, University of Western Ontario, Лондон, Онтарио, Канада; Gol – В.И. Голубев, ИБФМ РАН, Пущино. Остальные штаммы – из коллекции лаборатории молекулярной генетики, таксономии и экологии дрожжей ГосНИИгенетика, Москва.

ПЦР-анализ. Дрожжи культивировали на стандартной среде YPD при 28° С. Амплификацию различных участков ДНК ядерных и митохондриальных геномов проводили непосредственно на дрожжевых клетках или с предварительным выделением ДНК согласно методике (Булат, Мироненко, 1990). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли в ДНК-амплификаторах “Терцик”™ (Россия) и “Techne” (Великобритания). Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ) осуществляли с помощью эндонуклеаз *Alu*I, *Hae*III и *Hinf*I (“Fermentas”, Литва) в течение 12-16 часов при 37 °С. Разделение фрагментов рестрикции проводили в 1.7%-ном или 2.5%-ном агарозном геле при 50-55 В в 0.5× ТВЕ буфере (45 мМ трис, 10 мМ ЭДТА, 45 мМ борная кислота, рН 8.0) в течение 3-4 часов. Для типирования индивидуальных штаммов использовали ПЦР с RAPD-праймером OPA-11 и микросателлитными праймерами ([illegible]TG)$_5$ и (GTG)$_5$.

Секвенирование. ПЦР-продукты элюировали из геля при помощи набора "GeneClean Kit", согласно протоколу фирмы-изготовителя (Bio 101 Inc., США). Нуклеотидные последовательности по двум цепям определяли секвенированием по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе “Beckman-Coulter” (США).

Пульс-электрофорез хромосомных ДНК. Приготовление препаратов хромосомных ДНК проводили согласно методике (Наумов и др., 1993). Разделение хромосомных ДНК осуществляли в аппарате CHEF-DR III (Bio-Rad, США). В качестве буфера использовали 0.5× ТВЕ, охлажденный до 14° С.

Филогенетический анализ. Нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программ SeqMan package (DNAStar Inc., США). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программ CLUSTAL W и BioEdit version 5.0.9 (Hall, 1999). Филогенетический анализ исследуемых нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием алгоритмов Neighbor-Joining и UPGMA из пакетов компьютерных программ PHYLIP 3.52 (Felsenstein, 1993), MEGA 3 (Kumar et al., 2004) и TREECON (van der Peer, de Wachter, 1994). Индекс бутстрэп, определяющий статистическую достоверность ветвления групп, рассчитывали для 100 псевдореплик.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Разработка молекулярного метода дифференциации видов рода *Kluyveromyces*

В современной систематике дрожжей наряду с традиционными фенотипическими признаками широко используется секвенирование D1/D2 26S рДНК размером около 600 п.н. (Kurtzman, Robnett, 1998). Принято считать, что различия в 6 и более нуклеотидах (>1%) в районе D1/D2 26S рДНК свидетельствуют о принадлежности штаммов к разным видам, тогда как конспецифичные штаммы обычно имеют идентичные последовательности или различаются 1–3 нуклеотидами.

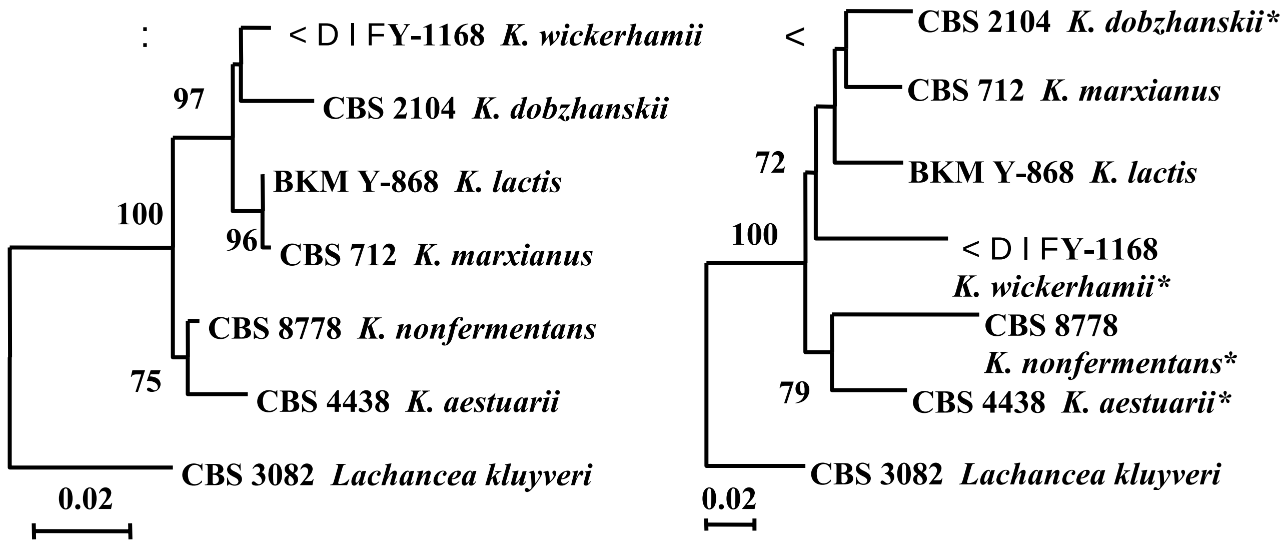


Рис.1. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей района D1/D2 26S рДНК (А) и гена *ACT1* (В) типовых культур видов рода *Kluyveromyces*. Приводятся значения бутстреп >70%. Шкала соответствует 2 нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. Звездочкой обозначены определенные нами последовательности, внесенные в базу данных ГенБанк.

С помощью секвенирования D1/D2 26S рДНК можно дифференцировать виды *K. dobzhanskii, K. wickerhamii*, *K. aestuarii* и *K. nonfermentas* (рис.1А). Однако данный участок обладает недостаточной специфичностью для разделения видов *K. marxianus* и *K. lactis,* D1/D2-последовательности которых различаются только одной нуклеотидной заменой. Более вариабельным участком рДНК является регион 5.8S-ITS, включающий ген 5.8S и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2. По этому участку рДНК можно дифференцировать шесть видов *Kluyveromyces*. Так, практически неразличимые по последовательностям D1/D2 26S рДНК виды *K. lactis* и *K. marxianus* достоверно различаются по последовательностям ITS1 и ITS2: 22

gmde_hlb^Zfu_gGZfbmklZgh\eq_lgh\b^ujh^Z *Kluyveromyces* lZd`_ fh`gh jZaebqbkv ihfhsvx k_d_gbjh\Zgby^b_jgh]h_gZ *ACT1*, dh^bjmxs[_]h hZdlbgZ (jbk. 1B). Wlhlh qZkly lh\dy_l[khe_\ZjbZ[_evguf ih kjZ\g_gbx^hf_gh D1/D2 26S j>G:D jZaebqbyb`^m\b^Zfb *Kluyveromyces* khklZ\bheh 40 ^h100 gmde_hlb^h\^mh_lf_lb, lvqlh nbeh]_g_lbq_kdjb_\vyihkljh_ggu_Z hkgh\Zgbb gmde_hlb^guo ihke_^h\Zl_evghkl_c *ACT1* b jZchgh D1/D2 26S j>G Dbf_xlkoh^gmx lhiheh]bx (jbk. 1). GZh[hb^o_j_\vyjh``b *K. aestuarii* b *K. nonfermentas* aZgbfZxl b[heh_l^Ze_gghh_h`_gb_

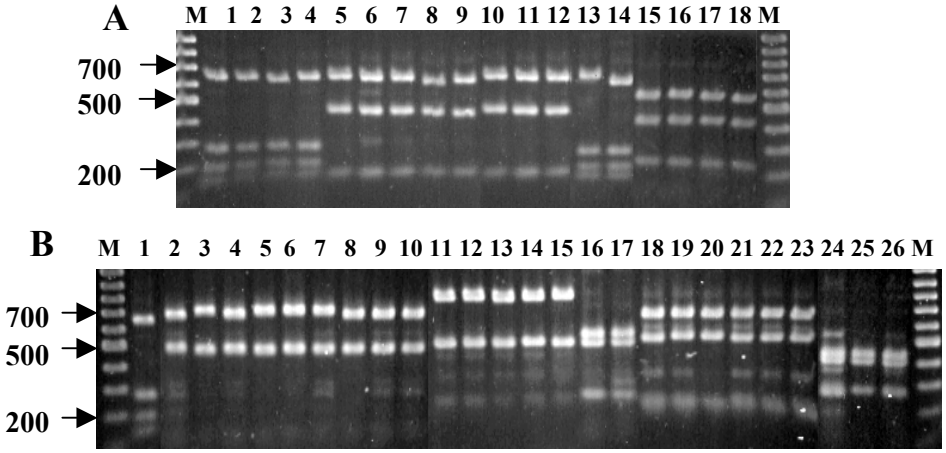
>eyb amq_gbyjh^gh]h hebfhjnbafZh``_c *Kluyveromyces* g_h[oh^bfh_jbjh\Z[hve vrbf dhebq_klhfh\ba_klgh\bc ^h\hc ijbgZ^e_`ghkl^bgZdkh_d_gbjh\Zgby_l^kyklZlhqgh ^h_fdbf ^hjh]hklhyfs_bfh^hbfg_ih^oh^bleyfZkkh\bhc_glbnbdZlbfh.\ >eywlbpo_e_[be_ijbf_gbf>JN-ZgZebao_adh^bjmxs_bo klj>G:D GZfbmklZgh\eq_lgh_kljbdlZagZgbZeba 5.8S-ITS-njZ]f_glZ G:Dk bkihevah\Zgb_f gmde_Hinf Zau

< g Z k l h y s \ j _ f y ^ e y b a m q _ g b k l m i g h j Z g b q _ g d g h e _ b q _ k l \ h r l Z f f h k *K. aestuarii* b *K. nonfermentas.* < g Z r _ f Z k i h j y ` _ g j b e h h e v d h l j b r l Z f f Z d Z ` ^ h j h a w l b \ b ^ h \ l h w l h f f m u k h k j _ ^ h l h k q b h e \ g b f Z g b _ g Z b a m q _ g g _ b l h u j _] b [j b ^ b a b j m \ _ b f ^ u h g j \ h ^ *Kluyveromyces*: *K. marxianus, K. lactis, K. dobzhanskii, K. wickerhamii*.

2. < g m l j b \ b ^ h i \ h e c b f h j n b ^ a j f h ` ` _ k *K. lactis*

Дифференциация молочных дрожжей K. lactis var. lactis и их ближайших диких родственников – европейской популяции "krassilnikovii".

K h] e Z k g h m s _ k l \ m x s l _ e Z k k b n b d (Zsiepenberg, Lachance, 1986; Kurtzman, 2003) \ b ^ *K. lactis* i j _ ^ k l Z \ e ^ \ g n f j y Z a g h \ b ^ g h k F h y f e h q g u _ m k \ Z b \ Z x e s Z b d _ l h ^ a j m ` ` , b h l g h k y d k *K. lactis* var. *lactis*, Z ^ b d b r _ l Z f f u Lac- n _ g h l b i d Z *K. lactis* var. *drosophilarum.* K i h f h s v x l > J N Z g Z e b a Z g _ d h ^ b j m x s n b q Z k l q j h \ G , D f h e _ d m e y j g d Z] b h l b i b j h \ Z b g l h P y J - Z g Z e b k a f Z b d j h k Z l _ e e b l i g j Z f c b f _ j Z f f b u i j h \ _ e k j Z \ g _ g] b _ g h f h \ f h e h q g u ^ o j h ` ` _ k *K. lactis* var. *lactis* b ^ b d b ^ o j h ` ` _ c b a _ \ j h i _ c k d h c i h i m e y p k b a s s i l n i k o v i i ".



J b . k **3.** J _ k l j b d l Z a Z g g u Z c e Z b f a i e b n b p b j h \ Z n g j g Z u] b _ g l f h _ \ `] _ g g h k] i h _ c k _ j Z IGS2 j > G D r l Z f f h k *K. lactis* k i h f h s v x w g ^ h g m d e u l Z a u *K. lactis* var. *lactis*: 1 – < D F Y-868, 2 – NRRL Y-1140, 3 – NRRL Y-1118, 4 – < D F Y-762; "krassilnikovii": 5 – < D F Y-831, 6 – < D F Y-834, 7 – Est86, 8 – Vor86, 9 – UCM Y-329; " k j _ ^ g _ Z a b " Z l k e Z U C M Y-1891, 11 – UCM Y-1892, 12 – UCM Y-1893, 13 – "vanudenii" < D F Y-1535; 14 – 158.01-1A; " \ h k l h q " g Z y – UCD 69-8, 16 – UCD 67-376, 17 – DV30, 18 – UCD 72-212; (B) 1 – *K. lactis* var. *lactis* < D F Y-868; *K. lactis* var. *drosophilarum*: 2 – < D F Y-1302, 3 – UWO79-169, 4 – UWO79-261, 5 – UWO80-48, 6 – UWO81-109, 7 – UWO80-17, 8 – UWO82-233, 9 – S80-549.2, 10 – S80-554.2; "pseudovanudenii": 11 – UWO79-127, 12 – UWO79-168, 13 – UWO80-12, 14 – UWO80-49, 15 – UWO82-210; " g h \ Z y 16 – UWO80-45, 17 – UWO85-256.1; " \ h ^ g " Z y 8 – UCD 71-45, 19 – CBS 6076, 20 – CBS 6169, 21 – CBS 6171, 22 – CBS 6172, 23 – CBS 6191; "phaseolosporus": 24 – < D F Y-1296, 25 – UCD 51-272; 26 – UCD 61-200; M – f Z j d _ f j h e _ d m e y j g k h \ g) 100 bp DNA Ladder ("Fermentas", E b l) . Z

Дрожжи *K. lactis* var. *lactis*, выделенные из молочных продуктов, клинических источников, имеют рестриктазные профили с четырьмя фрагментами размером около 650, 250, 200 и 100 п.н. (дорожки 1–4). Изоляты "krassilnikovii" характеризуются тремя фрагментами размером около 650, 450 и 100 п.н. (дорожки 5–9).

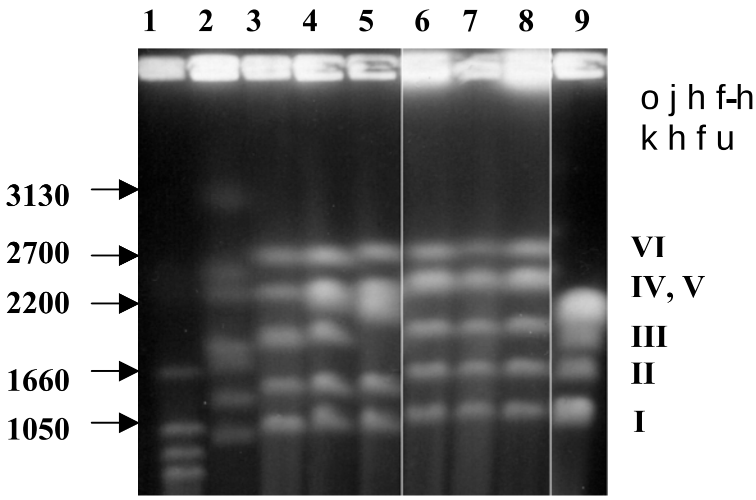


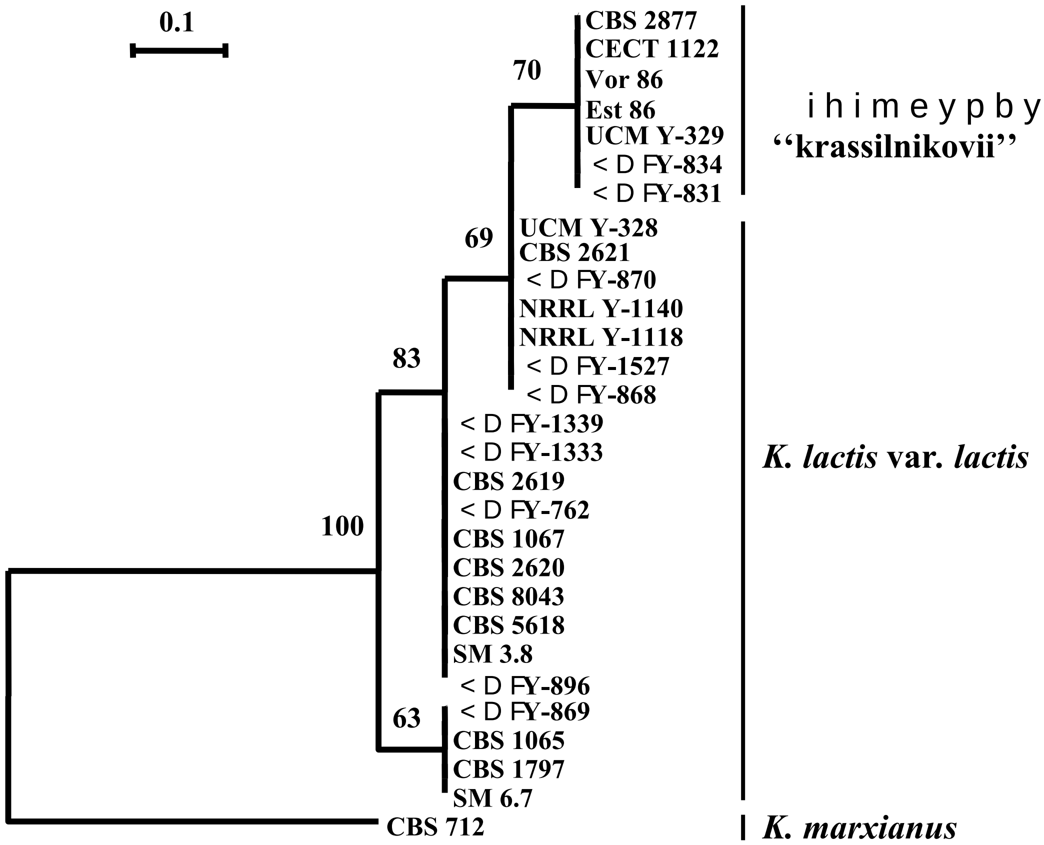
Рис. 4. Анализ молекулярного кариотипа штаммов *K. lactis* var. *lactis* и популяции "krassilnikovii". 1 – *S. cerevisiae* YNN 295; 2 – *P. canadensis* YB-4662-VIA, *K. lactis* var. *lactis*: 3 – ВКМ Y-868, 4 – NRRL Y-1118, 5 – NRRL Y-1140; "krassilnikovii": 6 – ВКМ Y-831, 7 – ВКМ Y-834, 8 – Vor86; 9 – *K. marxianus* CBS 712. Размеры хромосом (т.п.н.) приводятся по кариотипическим картам *S. cerevisiae* YNN 235 и *P. canadensis* YB-4662-VIA.

Электрофоретический анализ хромосомной ДНК показал, что штаммы *K. lactis* var. *lactis* и "krassilnikovii" имеют практически идентичные хромосомные профили с размером хромосом от 1050 до 2800 т.п.н. (рис. 4). Согласно интенсивности окраски бромистым этидием, четвертая полоса является двойной. Таким образом, штаммы *K. lactis* var. *lactis* и "krassilnikovii" имеют гаплоидный набор хромосом, равный шести.

Для установления генетического родства штаммов *K. lactis* различного происхождения был использован ПЦР-анализ с микросателлитным праймером $(GTG)_5$. Этот маркер имеет множественную локализацию в геноме дрожжей, что позволяет сравнивать большое количество полиморфных локусов. На основании сходства ПЦР-профилей была построена дендрограмма, на которой штаммы популяции "krassilnikovii" сформировали отдельную группу (рис. 5). Дрожжи *K. lactis* var. *lactis*, выделенные из различных молочных продуктов, и клинические изоляты распределились между остальными группами.

Проведенный молекулярный анализ свидетельствует о близком генетическом родстве молочных и госпитальных штаммов. Обнаруженные молекулярные маркеры позволяют дифференцировать молочные дрожжи *K.*

lactis var. *lactis* b] _ g _ l b q _ k d b [e b a d b _ k [j Z ` b \ Z x s b _ k y k h ^ g b f b a h j h ` b *K. lactis* b a _ \ j h i _ c k d b o i h i m e y p b c "krassilnikovii".



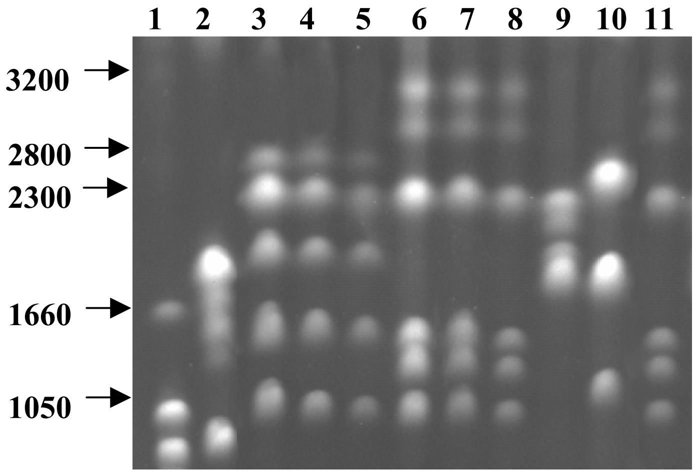
J b k. **5.** > _ g ^ j h] j Z f f Z ^ k l \ Z l Z f f h \ *K. lactis* var. *lactis* b i h i m e y p b b "krassilnikovii", h k g h \ Z g g Z y f Z l j b p _ j Z a e b q b c I P J - i j h n b e y f k f b d j h k Z l _ e e b l g h f i j Z c f _ j h f (GTG)$_5$.

Структура природных популяций дрожжей K. lactis. G Z f Z l _ j b Z e _ r l Z f f h \ j Z a e b q g h] h] _ h] j Z n b q _ k d h] h b w d h e h] b q _ k d h] h i j h b k o h ` ^ _ g b y b a m q _ g Z i h i m e y p b h g g Z y k l j m d l m j Z *K. lactis*.

I h j _ a m e v l Z l Z f k l j b d l Z a g h] h Z g Z e b a Z 2 - j Z c h g Z > G D [u e h ^ b n n _ j _ g p b j h \ Z g h 8 \ Z j b Z g l h \ *Lu*- i j h n b e _ c (j b k. 3). < i _ j \ m x] j m i i m g Z j y ^ m k h ^ h j h ` Z f b *K. lactis* var. *lactis* (Lac$^+$), \ h r e b l Z d ` _ b l b i h \ h c r l Z f f u i h i m e y p b b "vanudenii" b a Z e v i _ g k d h c h h l j Z g f u L 58.01-1A (j b k. 3 :, ^ h j h ` d b 1–4, 13, 14). R l Z f f u b a i h i m e y p b b "krassilnikovii" b a h e y l b j h \ Z g g u _ b a K j _ ^ g _ c : a b b k n h j f b j h \ Z e b \ l h j m x ] j m i i m (^ h j h ` d b 5–12). L j _ l v x] j m i i m h [j Z a h \ Z e b r l Z f f u \ u ^ _ e _ g g u _ b a Z e v i _ g k d h c h h l j Z g f u b a [h e _ m e > J N - i j h n b e b l j _ f y n j Z] f _ g l Z f b j Z a f _ j h f h d h e h 600, 450 b 150 i. g (^ h j h ` d b 15–18). M k _ \ _ j h Z f _ j b d Z g k d b o b Z n j b d Z g k d b o r l Z f f h \ [ u e h h [ g Z j m ` _ g h l j Z a e b q g u _ k l j m d l m j g u _ i j h n b e b (j b k. 3B, ^ h j h ` d b 2–26). > \ _ ] j m i i u i j _ ^ k l Z \ e _ g u k l \ _ g g h j Z a g h \ b ^ g h k l v x var. *drosophilarum* (] j m i i Z 4, ^ h j h ` d b 2–10) b i h i m e y p b _ c "phaseolosporus" (] j m i i Z 5, ^ h j h ` d b 14–26). H k l Z e v g u _ k _ \ _ j h Z f _ j b d Z g k d b _

ihimeyp jZlg_g_bf_elZdkhghfbqgZ abZ gbbpu eh [hagZqgZgfb dZ“pseudovanudenii” (]jmii5, ^hjh`db 1–15), “gh\Z”(y) ]jmii6, ^hjh`db 16–b17) b“\h^g”Z(y)]jmii7, ^hjh`db 18–23).

Fu ijh_elbhe_dmeyjgZjhbhlbibjh\Zgbb_aheyl bhaKj_^g_c :ab,b dhlhjuqgZ hkgh\Z gAlu I-j_kljbdpbbhbiZebl h^gm]jmiimk _\jhi_ckdbrfZ ffZfbb aihimeyp“bb krassilnikovii”, b ^Zevg_\hklhqgh] rlZffZ 158.01-1A, bf_xs_]h ^bgZdh Alu I-cj_kljbdlZ aighubekK. *lactis* var. *lactis* (jb.k6). Ojhfhkhfg>ZGyDrlZffZ 158.01-1A lZd`_dZdb lbih\udmevlmKml. *lactis* var. *lactis* b“krassilnikovii” jZa^_ebg Zkyvihehk jZaf_jhf 1050 ^h 2800 l.i.g, q_l\_jlZye hkkZgbakmhhl\_lkl\^mmi_e_lm ojhfhkh^hjh`db 3–5). Kj_^g_ZabZlakldeydZjbhlbibqhdZbZebkv koh`bl bih\hdmevlm“vanudenii”, h[jZa6moy jhfhkhfgihe hjkZaf_jhf hl 1050 ^h 3200 l.i.g (^hjh`db 6–8, 11).

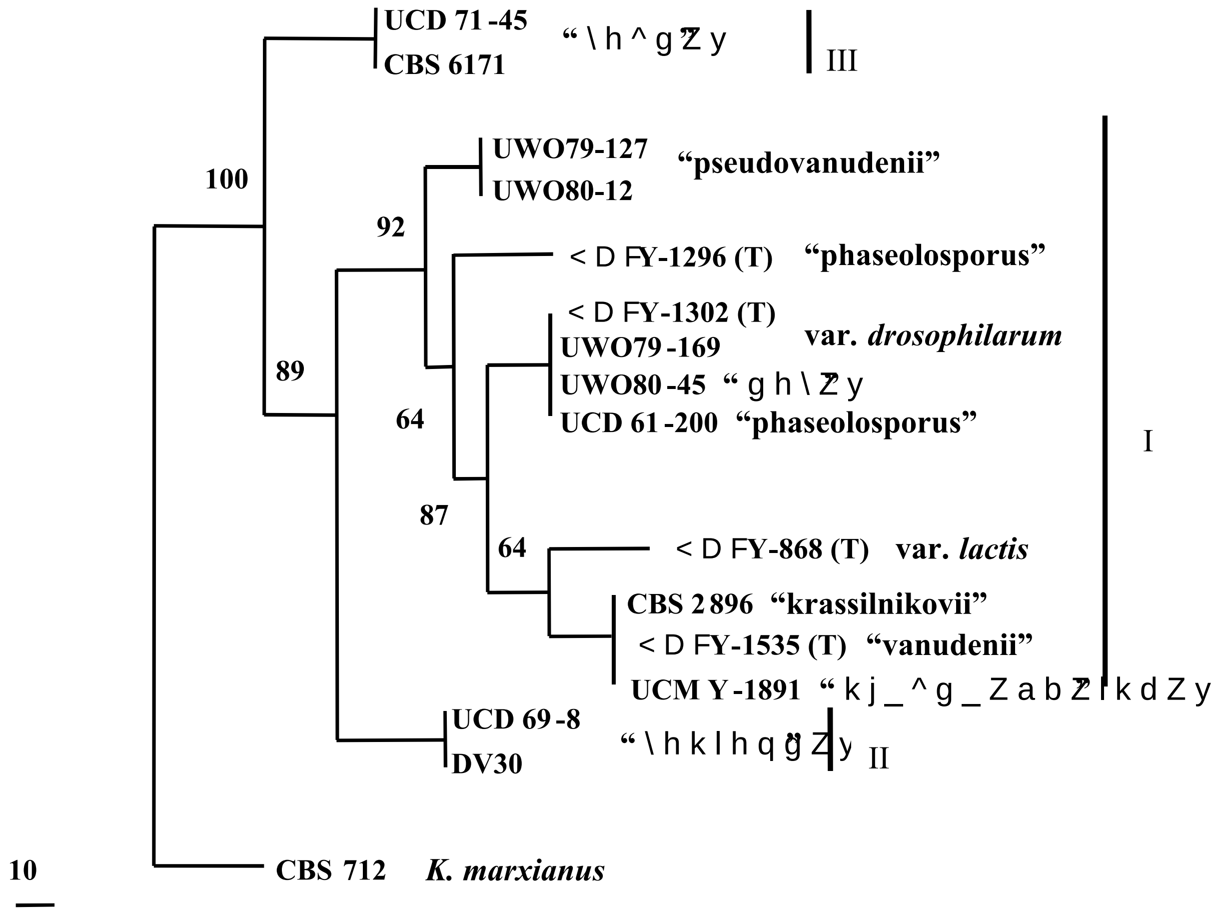


Jb.k6. :gZebfahe_dmeyjgZjb hlbirlZffh\K. *lactis*. 1 – *S. cerevisiae* YNN 295; 2 – *K. marxianus* CBS 712; 3 – *K. lactis* var. *lactis* <DFY-868, 4 – “krassilnikovii” <DFY-831; 5 – 158.01-1A; “kj_^g_Zab”Z 6 – UCM Y-1891, 7 – UCM Y-1892, 8 – UCM Y-1893; 9 – *K. lactis* var. *drosophilarum* <DFY-1302; 10 – “phaseolosporus” <DF Y-1296; 11 – “vanudenii” <DFY-1535. JZaf_jujhfhkh (l.i.g) ijb\h^ylkh dZjbhlbibq_kdZg^ZjlmS. *cerevisiae* YNN 235.

>eyhij_^_e_gbgy_lbq_kjhh^kl\ZlZffh,\bf_xsbpZaebqgu_ j_kljbdlZ aighubeIGS2-njZ]f_glh\GDb fhe_dmeyjgZ jbhlbiu fu ijh_elbbeh]_g_lbqZ_dkZdebdmade_hlbh^gkue_^h\Zl_evITS- hkl_c mqZklj>hGDHlghkbl_ey gg_]cmii,ulbih\hdmevlmK. *marxianus* CBS 712, gZnbeh]_g_lbq^jk_uf^_eyx lkbdeZkl(jbk7).

lj_^klZ\bl_ie_j\h]hdeZkl_jbZ_xlh^bgZdh\gu m de_hlb^gu_ ihke_^h\Zl_evghkljZlbebqZxihkl 1–3 gm de_hlb^a gZ fgZ<fgmljb wlh]hdeZkl_\jZ^_eyxlk ykm[deZkl_jjZ uckm[deZkl[tj_^bgbe

^jh``b K. lactis var. lactis, “vanudenii”, “krassilnikovii bkj_^g_Zab Zrl Zdfbc UCM Y-1891, dhlhjub f_xlh^bgZdhf lbe_dmeyjgZuj b hlbbu eb h^bgZdh\uk ljbdlZ a gju n beb IGS2- njZ]f_glh\ j>GD. Wlbr lZffu oZjZdl_jbamx ^ky glbqguf lbke_^h\Zl_evgh ITS1 yfb kh]eZkgh ebl_jZlmjgu f ^Zgguf (Naumov, Naumova, 2002)]_g_lbq_kdb bah ebjh\Zgu ^jm] hl ^jm.]Z



Jb.k 7. Nbeh]_g_lbq_kdh_ ^_j_\h, ihkljh_ggh_ gZ hkgh_ kj_^g_evg. 5.8S-ITS-jZchgh\ j>GD ^jh``_c K. lactis. Ljb\h^ylky agZq_gby [mlklj_>50 %.

Kj_^g_ZabZlkdbc rlZff bf__l h^bgZdh\uc k e_^h\Zl_evghklv ITS2 k rlZffZfb “krassilnikovii”/“vanudenii” b hlebqZ_lky hl rlZffh\ K. lactis var. lactis gZebqb_f g_kdhevdbo gmde_hlb^gu o \ ihabpby o 16 (jbk. 8). M rlZffZ 158.01-1 : \uy\e_gZ ^_e_pby ihegbl_ eyZgZy b K-Ly \ ihabpbb 570.

HklZevgu_ km[deZkl_ju ^ kl Z\e_gu_ _jhZf_jbdZgkdbfb rlZffZf.b K e_^m_l hlf_lbl, qlh K. lactis var. drosophilarum b “phaseolosporus” qZklbqgh]_g_lbq_kdb bahebjh\Zgu hl ^jm]Z hl fhehqguo ^jh``_c K. lactis var. lactis (Naumov, Naumova, 2002). Hl^_evgu_ km[deZkl_ju hjjfbjh\Zeb

rlZffu h[hagZq_gu gZ ih^_ l ihimeypby “pseudovanudenii” (]jmiiZ 5). JZg__ wlbrlZffu [uebb^_glbnbpbjh\Zgu dZd K. vanudenii (Lachance, 1980). L_fg_f_g, ih bahn_jf_glguf ihimeypbyf rlZffh\ gZb[he__ [ebadb dl_ffZf K. lactis var. lactis bhlebqZxlky ih \hdmevlmju K. vanudenii b rlZffh\ K. lactis var. drosophilarum (Sidenberg, Lachance, 1986).

GZhkgh\Z gbb ihe]_g_lbq_kdh]h ZgZebaZ 5.8S-ITS- mqZklkZ j>GD mkLZgh\e_gh koh^klо \hh ihimeypbb K. lactis var. drosophilarum. Ihke_^h\Zl_evghklb 5.8S-ITS j>GD wlbo ^jh``_c hlebqZxlky gZ h^gm gmde_hlb^gmx aZf_gm hl lbih\hc dmevlmju <DF Y-1302 (ljZgkb_jkby \ ihabpbb 207). RlZff UWO80-45 (ihimeypby “bgh\Zy b f_xsb_ gbdZev IGS2-j_kljbdlZaguc ijhnbev (]jmiiZ 6) g_hlebqZxlky gmde_hlb^ghc ihke_^h\Zl_evghklvx hl lbih\hc dmevlmju K. lactis var. drosophilarum <DF Y-1302.

	386	570	616	623	631
BKM Y-868	C	T	T	T	T
CECT 10356	.	.	.	-	.
BKM Y-1527	.	.	.	.	.
CECT 10361	.	.	.	.	.
BKM Y-1535	.	.	C	.	.
UCM Y-1891	.	.	C	.	.
UCM Y-1892	.	.	C	.	.
CBS 2877	.	.	C	.	.
CBS 2896	.	.	C	.	.
158.01-1A	.	C	C	.	.

(ITS2: positions 386–631; ▼ marks position 616)

Jbk. 8. KjZ\gbl_evguc ZgZeba gmde_hlb^guo ihke_^h\Zl_ev ghkl_c gmlj_gg_]h ljZgkdjb[bjm_fh]h k_ck_ IlS2 j>GD rlZffh\ K. lactis. K. lactis var. lactis: BKM Y-868, CECT 10356, BKM Y-1527, CECT 10361; “vanudenii”: BKM Y-1537; “kj_^g_ZabZ”: UCM Y-1891, UCM Y-1892; “krassilnikovii”: CBS 2877, CBS 2896.

Gmf_jZpby ihke_^h\Zl_evghklb ^Zgu ih lbih\hc dmevlmj_ K. lactis var. lactis <DF Y-868. Lhqdb h[hagZqZxl b^_glbqgu_ ihke_^h\Zl_evghklb, «–» \u^_e_gguc gmde_hlb^.

<lhjhc deZkl_j, nbeh]_g_lbq_kdb [jZah\Zgguc ihimeypbyfb >Zevg_\hklhqghc ^b\hdhc ihimeypbb “kj_^g_ZabZ”, 5.8S-ITS- ihke_^h\Zl_evghklb dhlhjuo hlebqZxlky hl rlZffh\ K. lactis ih 5–10 gmde_hlb^ZF. RlZffu wlhc ihimeypbb, ih]_g_lbq_kdb hl^Ze_ggu_ hl K. lactis var. lactis, h[eZ^Zxl gbdZevguf hlebqb_f ih ^ebg_ IGS2 b gba dhc (64–68%) klbih\ufb dmevlmjZfb K. lactis var. lactis b K. lactis var. drosophilarum (Fuson et al., 1987; Naumov, Naumova, 2002).

RlZffu UCD 71-45 b CBS 6171, bahebjh\Zggu_ \ NjZgpbb, knhjfbjh\Zeb h^_lbcdeZkl_j ihimeypby “\h^gZy” 5.8S-ITS-

ihke_^h\Zl_evhgdhZkalZeohZkb[he^b_j]_glgubfbhlebqZebkv ij_^klZ\bl_ee_Zkl1jZb 2, khhl_lkl_6-8 hb 10 gmde_hlb^gufb aZf_gZfbbZg_[ueh mklZgh\e_qgh rlZff UCD 71-45 bf_,_l khhl_lkl_72% b 78% >G:-> GD j_ZkkhpbZpbbb\ufbdmevlmjKZfb *lactis* var. *lactis* b *K. lactis* var. *drosophilarum* (Fuson et al., 1987).

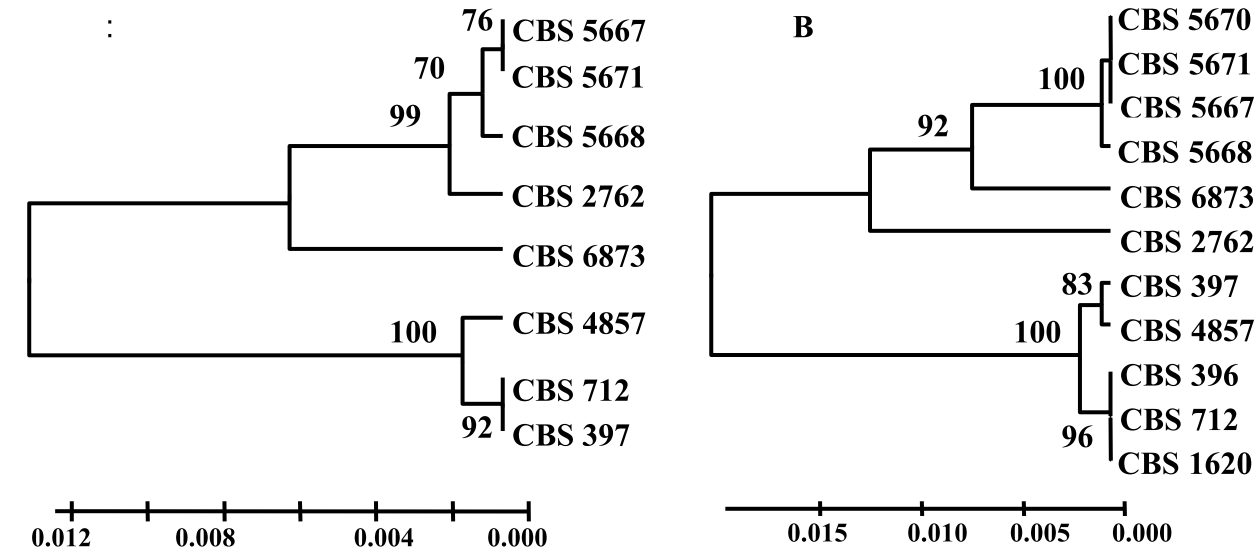
LZdbhf[jZa,h\fb^K. *lactis* bf__lkeh`gukhkl Zb\dexqZgZ ljy^km dmevlmjgufhfbhqgu^fbh``Zf K. *lactis* var. *lactis* ^bdbw_dheh]bqbkdb_ ]_h]jZnbq_ikdmbe_y.pHlbe_dmeyjgufb^ZfbdZa[glZ_jh]_gghklv lZdkhghfbq_kdZgh\b^gKh. *lactis* var. *drosophilarum*. >bnn_j_gpbjh\Zgh ^_\yl]v_g_lbq_khdbme yp^bjh``_lLac⁻: iylv\ K__jghfc_jbd(var. *drosophilarum,* "phaseolosporus", "pseudovanudenii", "gh\Z yb "\h^g"Z,yih h^ghc?\jhi ("krassilnikovii"), Kj_^g:ab ("kj_^g_Zab"),IKdGZhyc :njbd ("vanudenii") b\>Zevg_\hklhaqbgh("chklhq"g.Zy

3. <gmljb\b^hi\hecbfhjnbajfh``_ K. *marxianus*

< gZklhys\j__fy\b^K. *marxianus* h[t_^bgyg_lkdhe\Zdhkh-gh\ kbghgbfh K. *fragilis* – fhehqg^uj_h``,bkihkh[gu[jZ`b\ZelZdlh,*K.* *bulgaricus* b *K. cicerisporus* – ^jh``,b\u^_ey_fbuafhehqgujbh^mdlbh\ fe_dhibl Zxsbh odZdijZ\b,ehk[jZ`b\Zxsbe_Zdlh,aKm *wikenii* – x`ghZnjbdZgkogb^_fbqg^jh``bbaZedh]hevmgujof_glZpbhgguo ijhp_k,khg_kihkh[gmuk\Zb\ZelZdlhab *K. marxianus* – ijbjh^gu_ rlZffu, kihkh[guh_evdZhkkbfbebjhbZebk j_^dbkemqZkyeoZ[h k[jZ`b\ZleZdlh.aKmj_^brlZffh\K. *marxianus* \klj_qZxlkZ,d`_ debgbq_kabe_ykihkh[gu[jZ`b\ZelZdlh.am

Fu ijh_elbkjZ\gbl_evfgle_dmeyjgah.mq_g55b rlZffh*K.* *marxianus,* \u^_e_ggujZ aebqgukbhqgb\d?h\\jhi,:njbd,:f_jbdb X`ghc:ab.b<b^h\mixbgZ^e_`gh lkZlfh\hij_^_eygeZbh kgh\Zgbb *Alu*I-j_kljbdpbGS2-jZchgj>ZG.DJy^rlZffh,\ihemq_gglZ lactis var. *lactis* b *K. vanudenii*, [uebj_b^_glbnbpbjhg\ZfgluZ K. *marxianus.* < hlebqbh l K. *lactis,* bamq_gg lZffu *K. marxianus* bf_ebjZdlbq_kdb b^_glbqgiuh ke_^h\Zl_ev\ghmkljb ggljZgkdjb[bjm_kfu ck_jh\ ITS1 b ITS2. ?^bgbqgum_de_hlb^Zgfu_,gu[gZjm`_g\gwlhfZchg_ j>G,Dg_k\yaZgkuwdheh]bq_kkdebbj_h]jZnbq_kjdhbkoh`^_gb_f rlZffh.\ JZaebqfbÿ^mrlZffZfb[uebh[gZjm`_iguhgmde_hlb^guf ihke_^h\Zl_evgjhelyfZjbZ[_evgmupZkldjh>\GD– f_`]_gguo ki_ck_]GS1 b IGS2. RlZffu *K. marxianus* hlebqZebkh^ebgw lbo mqZk,ldZ\bihbogmde_hlb^kghkflmZ\Hm[gZjm`_\gkuZ\djZaf_jhf h4 ^h28 gmde_hlbh^^gbolZffh\bbohlkmlklmbjm].bo

GZhkgh\Zgubjb Z\g_ggumode_hlbi^hgkueo_^h\ZI_evghkIZk_ldh\ IGS1 b IGS2 [uebihkljh_gmube h]_g_lbq^_kjd_b, vbf_xsbkoh^gmx lhihehb](jbk.9).



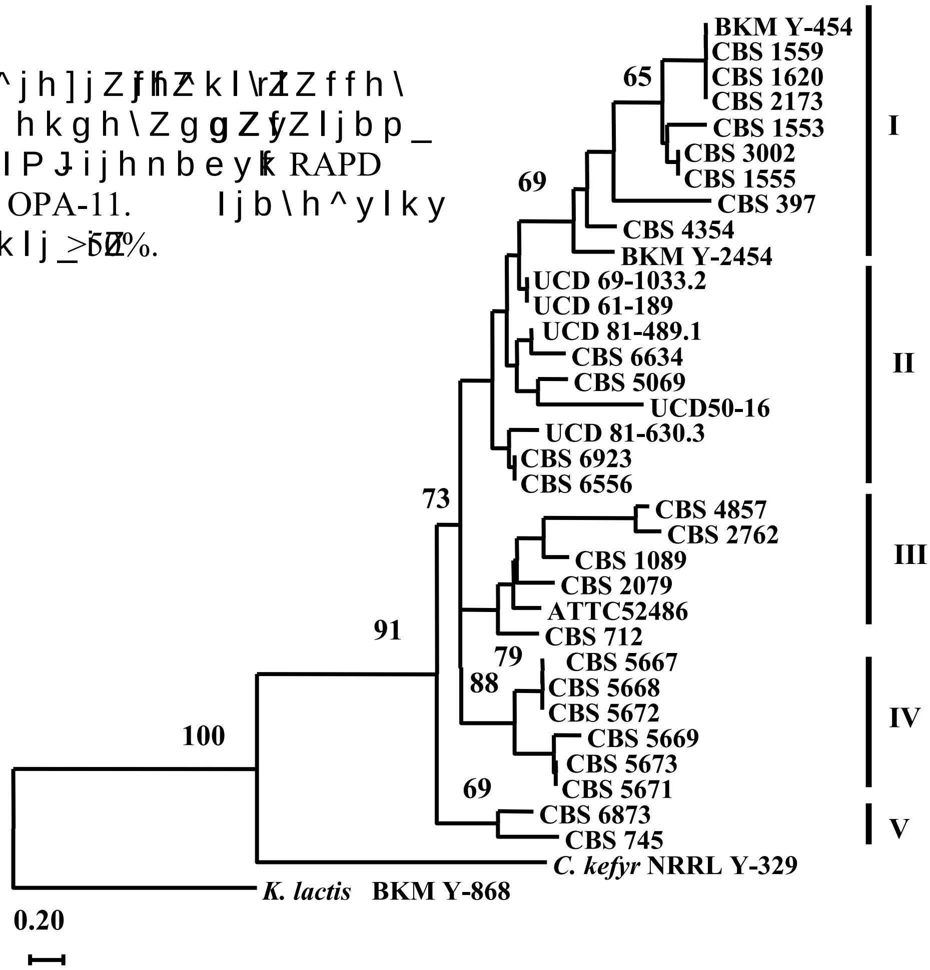
Jbk.9. Nbeh]_g_lbq_kdZ_bgmode_hlbi^hgkueo_^h\ZI_evgh`k_lgh]h ki_ck_jZ IGS1 (:) b IGS2 (<) j>GD^jh``_ K. marxianus. ljb\h^ylkay gZq_gby [mlkljui >50%.

X`ghZnjbdZg^kjdhb`_bbaZedh]hevgu_jfb_glZpbbCBS 5671, CBS 5667 b CBS 5668 knhjfbjh\Zeb \ucdeZk_dj dhlhjh fjbfudZxl lbih\Zdmevlmj K. bulgaricus CBS 2762 b ihq_ggumcZff baX`ghc :njbdbCBS 6873. Ke_^mlfl_lb, qlhrlZffCBS 6873, lZd`_dZd^jh``b K. wikenii, g_kihkh[_gbebabjh\ZlvlZdlha<mlhjhcdeZkl_\ juxqZ_l lbih\ud_mevlmj K. marxianus CBS 712, K. fragilis CBS 397, K. cicerisporus CBS 4857, ]hkibl Zevgu ZcffCBS 1620 b ijbjh^gu c ahe CBS 396. >jh``b K. wikenii hlebqZxlk hklZevgu qmoq_grZffh\lZd`_ih gmde_hlb^ghc ihke_^h\ZI_evghklb]_gZ ACT1: ljZgk_jkbb L-Y\ ihabpbb 351 b ljZgabpbb L-K\ ihabpbb 552, kh]eZkghf_jZpbbih ke_^h\ZI_evghk]_gZ ACT1 lbih\hcmevlmj K. marxianus CBS 712.

GZhkgh\Zgbb PbZgZebaZ RAPD-ijZcf_jhf OPA-11 rlZffu K. marxianus jZaebqgujh hbkoh`^_gbyjZaey^_ebeghkiylv]jmiin (jbk.10). l_j\mx]jmiiimnhjfbjh\ZeebvrbgkflhehqgulcZffh\b]hkiblZevgu_ bahey lu hkhklZ\h jhbljl v_]jmii\hrebbjbjh^gu bahey lu rlZffu, \u^_e_gguf e_dhiblZx, sbbjo_lv]jmii lZd`_ihiZeehehqgulcZff CBS 2762. RlZffu baZedh]hevgu_jfb_glZpbbjZah\Zq_ b_jlj jmiim

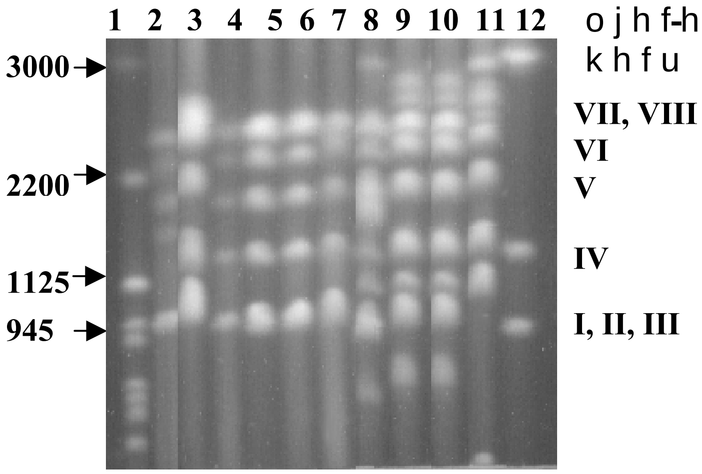
< khklZivlhc]jmiiu\hrebrlZffu CBS 745 b CBS 6873, bahebjh\Zggu_ bjh^gu okl hqgb\d:m\jbd_

Jb\k. **10.** >_g^jh]jZffZ kljZffh\ *K. marxianus,* hkgh\ZggZy gZ ZgZebi_ jZaebqbc IPJ-ijhnbeyf RAPD ijZcf_jhf OPA-11. Ijb\h^ylky agZq_gby [mlkljw>i 50%.



G_^Z\gh ihe_\h_]_g_lbq_kdh_ bae_qbe jZaebqby bfhjnbd ljZebeh \ jZaZpbb eZdlhamu^jh``_c *Kluyveromyces,* \dexqZy lZffu bamd ZaZg]gmoi (GZmf h\, 2006). Mkl Zgh\e_gh, qlh fhehqgu_ lZffu h[eZ^Zxl bevghc eZdlhagh_jc_Zagh, a Z\bkyshl^uoZgbh]^_ Zdjbjh^gu_ ahey lu oZjZdl_jbamaxlky kbykyshl c^uoZgbkye Z[h c_jf_Zag Zdlb\ghklv Wg^_fbqgu gh Znjb dZg^kdh``bbaZedh]hevgu_ jf_glZpbhgguo ijhp_kk, ohlZ djZ\be, \hh[s_bf_x Zdlb\gih_ jf_ZaeZdlhau

DZjbhlbibq_kdh_ bae_qbay \bekoh^kl\ dhjhfhkhfgu ijhnbe_c ijbjh^gubo aheybh\ lZffh\ bZedh]hevgu jf_glZpbhgguo jhfhkhfgZy >GD jZa^_eb Zkb ehjkZaf_jh ij bf_jgh h1000 ^h 2400 l.i.g (jbk. 11). Bkoh^by bagl_gkb\gh kdljZrb\Zgbyjhf bklufw lb^b, _\f_jogyih ehkZ y\ey _lky kk\yh cg, hZg b`gyih ehk Zjhcg. ZlyZ dbhf [jZa, h]lZiehb^gb k_eh ojhfhkhmfwlbpl Zffh, \ih-\b^bfh, fjmZ\ghhkv. Kk lh`_\j_f, ykj_^b fhehqgu lZffh\h[gZjm`_gZqbl_eiv hgeubcfhjnbd lZjbhlbibq_kdbc iZll_jg ih qbkebmjZaf_jm jhfhkhfgu oehk F hehqgu lZffu *K. marxianus,* \hafh`gh h^_j`Zl ihegbl_eyojhfhkhfl ehfhbe]hfheh]bqgu_ ojhfhkhfbuaf_g_ggjZaf_jh, wlhfkfuk e_fhehqgu ^jh``b *K. marxianus* koh`b dmevlmjgu lZbf Zfb^jh``_a *Saccharomyces cerevisiae,* ^eydhlhjuo ZjZdl_jgu gZqbl_eiv hgeubcfhjnbf ahfe_dmeyjdZjbhlbih\ (Bakalinsky, Snow, 1990; GZmfh\Z, 1993).

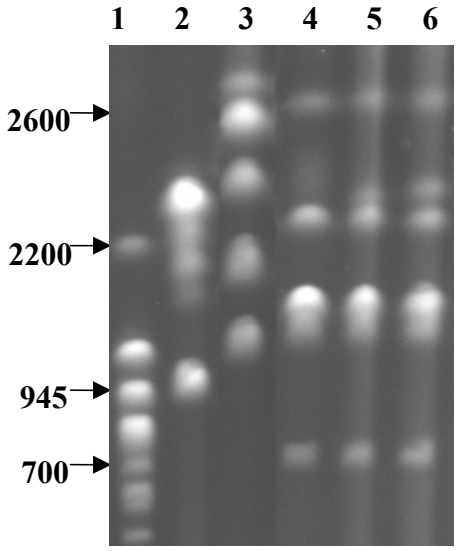


Jbk. **11.** :gZebf ahe_dmeyjgZjbhlbihlbihZffh\ *K. marxianus.* 1 – *S. cerevisiae* YNN 295; *K. marxianus:* 2 – CBS 712, 3 – :LLK 2486, 4 – UCD 50-16, 5 – CBS 5671, 6 – CBS 5672, 7 – CBS 5669, 8 – CBS 2762, 9 – CBS 397, 10 – <DF Y-2454, 11 – CBS 4857, 12 – NRRL Y-329. JZaf_jouj hfhkhf (l.i.g) ijb\h^ylky ihZjbhlbibq_kdhfm klZg^Zjlm *S. cerevisiae* YNN 235.

lhemq_gguZ fbj_amevlZlu ubl_jZlmjgu^Zggu (uGZmfh, 2006) k\b^_l_evkl\mxl h`ghkljh_gbb ^ZK. *marxianus*, \dexqZxs_ljb ihimey pbb: 1) k h[kl_ggh “marxianus” – ijbjh^gu_ hkfhihebl^gjuh_``b(\ khklZ\ lhc ihimeypbb\ h^ bb ih\Zdym evlmjbZ (CBS 712); 2) “fragilis” – fhehqguh_\b,^gZhd`dhkfhihebl^gjuh_``bbdebgbq_kdbe_y; 3) “wikenii” – wg^_fbq^gjuh_``bbaZedh]hevng_uj fb_glZpbhiggh pokk\h\ X`ghcnjbd_

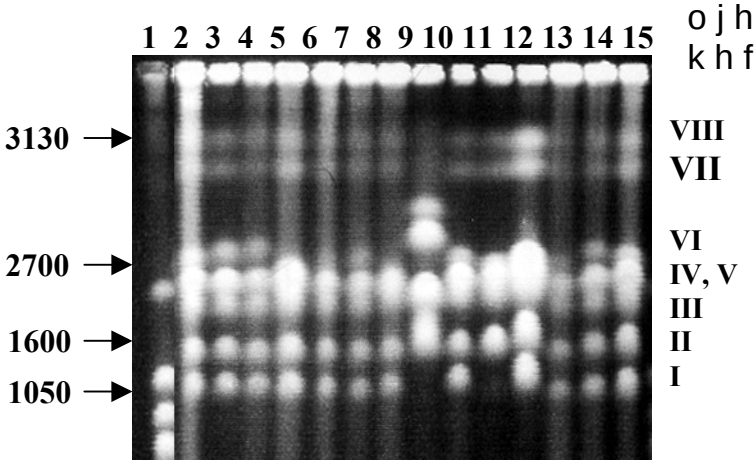
4. Fhe_dme-yjgh_lbq_kdbh[_gghikblb^gui ihimeyp^bjh``_c
K. wicherhamii b***K. dobzhanskii***

>jh``b *K. wickerhamii* b *K. dobzhanskii* h[blZxl kdexqbl_evgh ijbjh^_< gZklhysr\j_fyba_klgh[hevrhdhebq_kll\Z hffh\ *K. wickerhamii*, \u^_e_gg\u oh kgh\gh\f K__jgh:f_jbd_< gZr_f jZkihjy`_gbbbe h6 rlZffh,\ bahebjh\Zg\guK oR: b DZgZ^D kh`Ze_,gb ^Zevg_\hklhbcaghue_y *K. wickerhamii* (;b[bdh\bZ^j, 1987, 1988, 1990) g_khojZgbe \blk_vbamq_gguZ ffu *K. wickerhamii* bf_xl b^_glbqgue_dmeyjgZjbhlbk 6 ojhfhkhfguifh ehkZjfZ af_jhf hl700 ^h 2600 l.i.g (jbk. 12). Bkoh^by abgl_gkb\gkkl_ljh _,gbjy lvy ihehkkZgbakmh^_j`b[he_h^ghojhfhkhfluZdbh[jZa, h]fZiehb^gh_ qbkeohjhfhkh^jh``_ *K. wickerhamii*, hq_\b,^jgZh\gu hkv.fk hlebqbe hlk__jhZf_jbdZ^gjk`b_ *K. lactis* var. *drosophilarum*, khhl_lkl\mxsZy ihimeyp b\ *K. wickerhamii*, _jhyl, gyh\ey_lkyg_lbq]kfdhb]_g.ghc



Jb.k **12.** : g Z e b a f h e _ d m e y j g u o d Z j b h l b i r h Z f f h \ *K. wickerhamii.* 1 – *S. cerevisiae* YNN 295; 2 – *K. marxianus* CBS 712; 3 – *K. lactis* < D F Y-868; *K. wickerhamii*: 4 – < D I F Y-1168, 5 – UWO85-330.5, 6 – UWO85-396.2. J Z a f _ j u o j h f h k h (fl. i. g) i j b \ h ^ y l k i y h d Z j b h l b i b q _ k d h f m k l Z g ^ Z S j. *cerevisiae* YNN 295.

> j h ` ` b *K. dobzhanskii* j Z k i j h k l j Z g \ h g u f g h] b o q Z k l y k o \ _ l Z b i j _ ^ k l Z \ e y k l h [h c m ^ h [g m f x h ^ _ e v ^ e y i h i m e y p b - h] g g h l b q _ k d b o b k k e _ ^ h \ Z F g u b i c h \ _ e k o j Z \ g b l _ e f v h g e h _ d m e y b j g h m q _ 3 0 g h r l Z f f h \ *K. dobzhanskii*, \ u ^ _ e _ g h g 2 o j h i _ K _ \ _ j g h f c _ j b d b g Z > Z e v g < h i k l h d _ R l Z f f u b a h e b j h \ Z g k g u \ _ j g h f c _ j b d b g Z > Z e v g < h i k l h d h k k b Z b l Z d ` _ [ h e v r b g k l \ h j h i _ c k d r h d Z f f h \ b f _ x l [ e b a d h e _ d m e y j g u _ d Z j b h l b k Z u i h e h k Z j f Z b a f _ j h i f b f _ j g h l 1040 ^ h 3130 l. i. g (j b. k 13, ^ h j h ` d 1–8, 10–15).

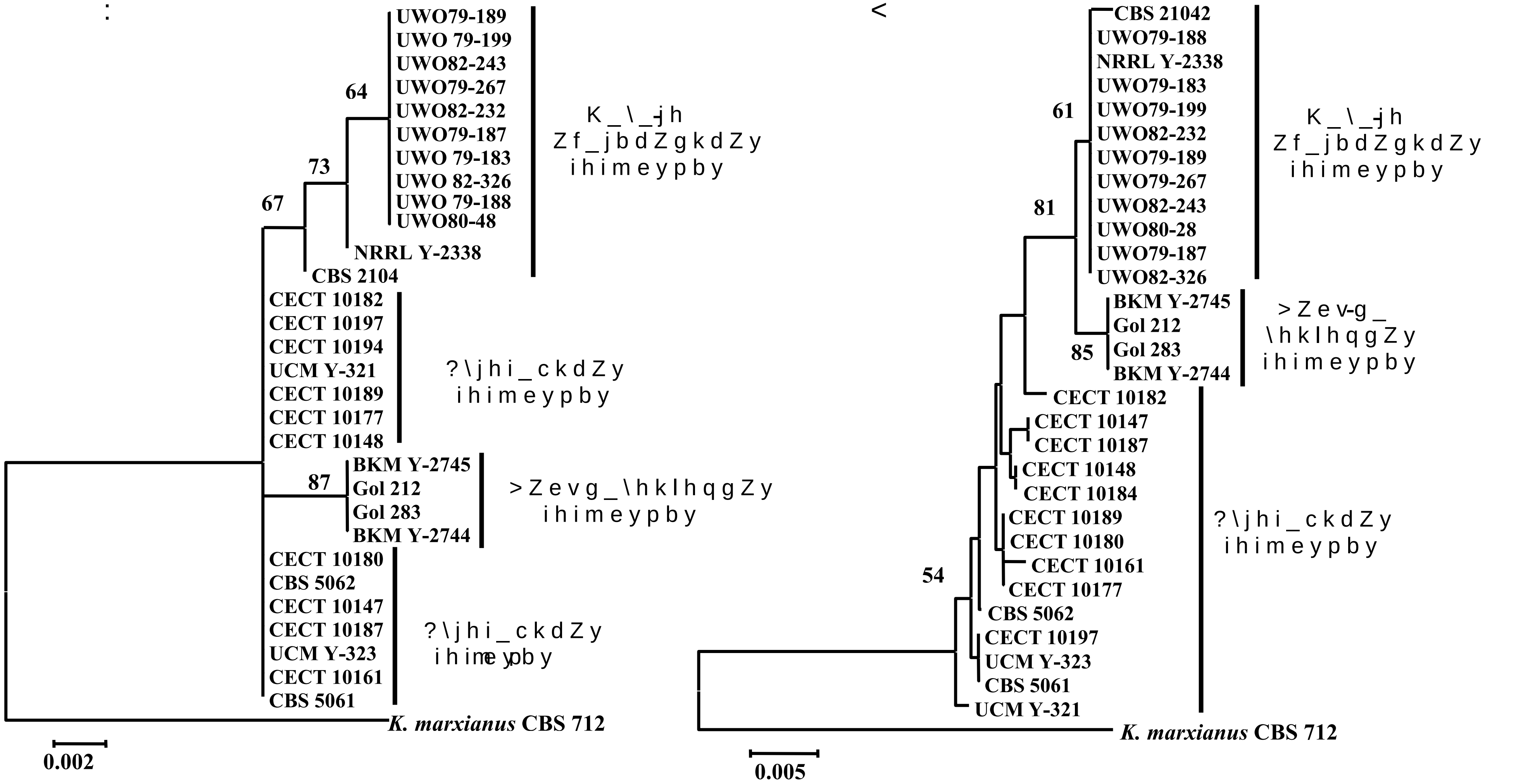


Jb.k **13.** : g Z e b a f h e _ d m e y j g Z u j o h l b i r h Z f f h \ *K. dobzhanskii* 1 – *S. cerevisiae* YNN 295; *K. dobzhanskii*: 2 – CBS 2104, 3 – UWO80-28, 4 – UWO82-232, 5 – UCM Y 321, 6 – UCM Y 323, 7 – CBS 5061, 8 – CBS 5062, 9 – CECT 10147, 10 – CECT 10180, 11 – CECT 10187, 12 – CECT 10189, 295. 13 – < D F Y–2745, 14 – < D F Y–2744, 15 – Gol 283. J Z a f _ j o u j h f h k h (l f i. g) i j b \ h ^ y l k h y d Z j b h l b i c h d h f m k l Z g ^ Z S j. l m *cerevisiae* YNN.

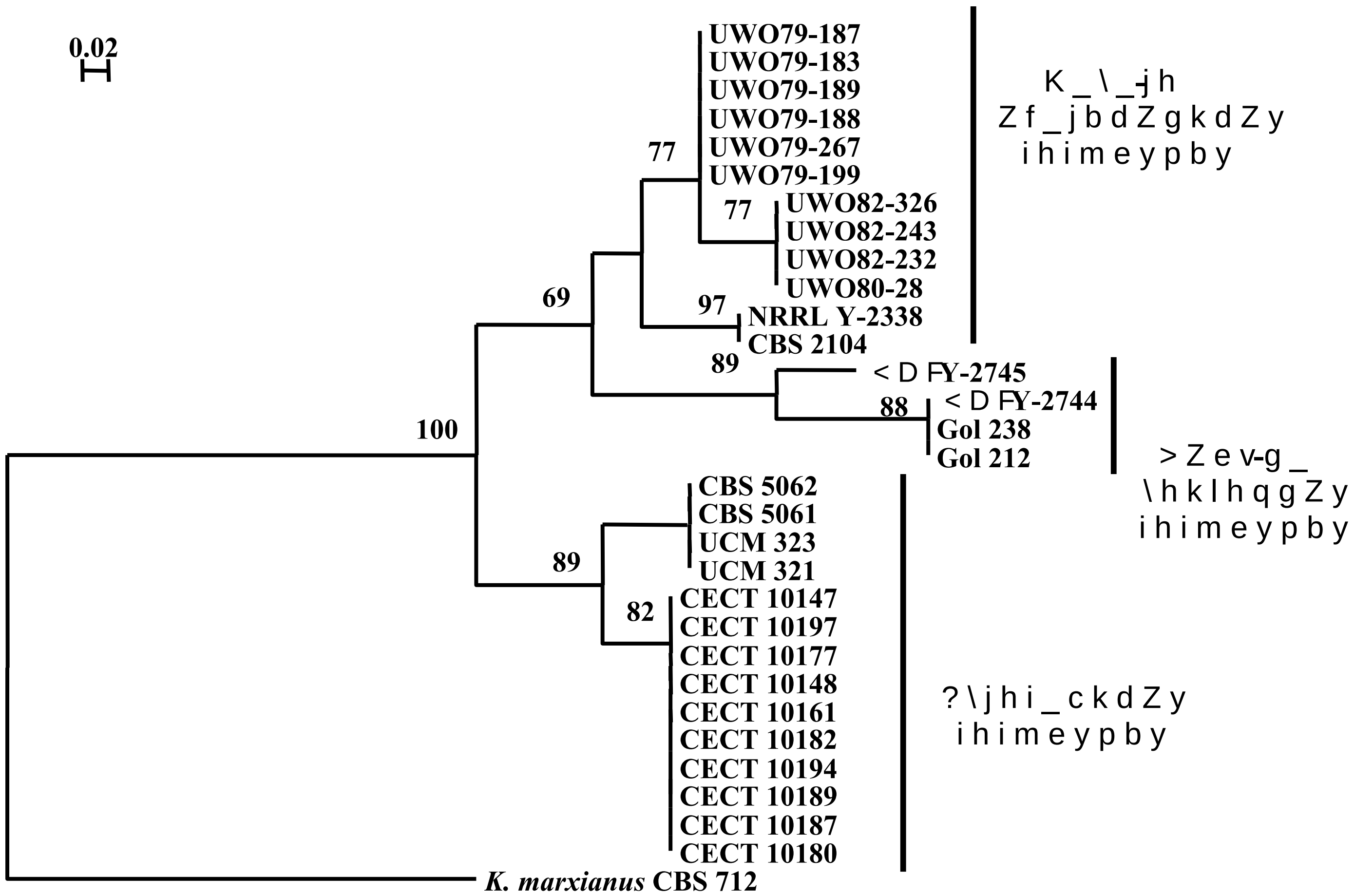
K h] e Z k g h I _ g k b \ g h k d j b Z r b \ Z g b y b f y f b k l u f w l b ^ b , _ i h e h k V Z , ih-\ b ^ b f h , f m y \ e y _ l k ^ y h c g h B k d e x q _ g b y \ e y x l k y b k i Z g k d b o rlZffZ K?KL 10147, K?KL 10148 b K?KL 10177, h[eZ^Zxsb_ ki_pbnbq_kdbf b jgZ fkb4 ihehk Z f^b_badhlhju ohhl_lkl\mxl ojhfhkhf IZ b III klZg^Zjlgh jZ]ahf_jZ h] ^ d Z Z d kl Z \ r b _ ^ k y y \ e y x l k y mgbdZevgu ^ uf j h h ` d 9 Z . Bkoh^ by a bgl_gkb\gh k k l h q _ , g b j y gb `gb_ ihehkfuh]mkh^_j`Z[lhve_h_^ghocjhfhkhfuZdhf[jZa,h]fZiehb^gh_ qbkeh ojhfhkhfm ^jh``_c K. dobzhanskii, _jhylgh jZ\gh\hkv.fb H[gZjm`_gh ue cbfhjnbdaZ jbhlbibhklZgkdhbZ ffh\ K. dobzhanskii fh`_l k\b^_l_evkl\hh\Z kvms_kl\h\Zgbb ^b_evghwdheh]bq_kdho ihimeyp bb

K p_evx amq_g bj by h^ghj]hebfhjnba^fZh``_c K. dobzhanskii [ueijh_^_g ZgZ eb am de_hlb^ighku e_^h\Zl_evg 5.8S-ITS-q ZchgZ j>GDb fblhohg^jbZev g h g Z COX2 m 30 rlZffh\wlh]hb^.ZGZh[hbo nbeh]_g_lbq ^_kjd b ^ vo y bghkbl_e vg g hg_]c jmii u K. marxianus CBS 712 \u^_eyxlkyb deZkl_j jZb.k 14). I_j\uc deZkl_j h[jZah\Zg k__jhZf_jbdZgkdbfbZbb.bGmde_hlb^gkue__^h\Zl_e 5.8S-ITS b j>GDb njZ]f_g]lZ g COX2 m[hevrbgkl\lZbr lZffh\[uebb^_glb.qgu >Zevg_\hklhbqahue,y g_hlebqZxsbi_h k hyke_^h\Zl_evg 5.8S-ITS yf j>GDb]_g COX2, \hreb\ khklZ\ lhjh]h deZkl_j?Zjhi_ckdbZffu knhjfbjh\Zlej_blbc deZkl.lh 5.8S-ITS-ihke_^h\Zl_ev gh hkl ZyVffu g_hlebqZefb_k`v^mkh[h cjh]^dZ dh ihke_^h\Zl_evg_hgk COX2, h[jZah\Zg b fZby]jmiiZy\ey_lk[yhe__]_l_jh]_ggh c f]jmii,u knhjfbjh\Zggku__jhZf_jbdZgkdbfZbevg_\hklhqbafbeylZfb Gmde_hlb^ighuke_^h\Zl_evg_hgk ZCOX2 _\jhi_ckdbbZffh\ jZaebqZ2x 1-7kg mde_hlb^ agZuffbg,Zlfhb]^dZdbohlebqbbyhklZevguo rlZffh K. dobzhanskii ih^ZgghmmqZkkdhmklZ\ejyk?l^h11 aZf_g

>ey[he__^_lZevgh]ahmq_gb]bg_lbq_kdjh^kl\ZrlZffh\ K. dobzhanskii jZaebqgh]h]hjZnbq_kjdhh]hoh`^_fgubijh\_ebPJ-ZgZebaafbdjhkZl_eebiljgZucff_jh (GTG)5. GZhkgh\Zgbbamq_gguo IPJ-ijhnbe_bcamq_gdhZffu K. dobzhanskii lZd`jZkij_^_ebgeZkbv]jmiiukh]eZkghj_h]jZnbq_kjdhhbfkmoh`^_gbk15). <gmljbZ`^hc ba]jmii\uy\e_ighebfhjnbaPFJ-ijhnbe_cZ,dmk__jhZf_jbdZgkdb rlZffh\h[gZjm`_lghuih^]jmi,ib^gbZadhlhjuho[jZah\ZlgZffZf,b \u^_e_ggulfkhR:, ZhklZevgu^u_ij_^klZ\e_dZugZ^kdbafbeylZfb <lhjZy]jmiijZ\dexqZxsZyjhi_ckdbZffu, jZa^_ebeg Zk^_ ih^]jmi.ik i_j\mxh^]jmiihiZeblZffu,\u^_e_gghNjZgpbbgZ MdjZbgh]^dZdk_bkiZgkdbZffu\hreb\khklZ\lhjhch^]jmii.u >Zevg_\hklhqbaue ylkunhjfbjh\Zlejb lvx]jmiimdhlhjZlyZd`_ ij_^klZ\e^_\gmZfiyh^]jmiiZfb



Jb.k **14.** Nbeh]_g_lbq_kdb_ ^_j_\vy ... 5.8S-ITS ... (:) b ... *COX2* (<) ^jh``_c *K. dobzhanskii.* ... >50%. ... 1000 ...



Jbk. **15.** > _ g ^ j h] j Z f f Z ^ k l \ r Z Z f f h \ *K. dobzhanskii,* h k g h \ Z g g Z Z k y o h ^ k l i \ h _ IP-i j h n b e y k i j Z c f _ j h f (GTG)5. I j b \ h ^ y l k y g Z q _ g b y k l j _ 50.

L Z d b f h [j Z a h f \ b ^ *K. dobzhanskii* i j _ ^ k l Z \ e _ g f y] _ h] j Z n b q _ k d b f b i h i m e y p b y f \ j h i _ c k d h c , d h _ \ _ j Z f _ j b d Z g k d h c g _ \ h k l h q g h c , h l e b q Z x l k y IP-i j h n b e y f k i j Z c f _ j h f (GTG)5, Z l Z d ` _ i h i h k e _ ^ h \ Z l _ e v g h k l y f g g l j Z g k d j b [b j m _ f u o k _ j h ITS1/ITS2 b f b l h o h g ^ j b Z e v g h] h] _ g Z *COX2.* K h] e Z k g h e _ d m e y j g Z f b l h i b i b j h \ Z g b x k j Z \ g b l _ e v g h f m Z g Z e b a m g m d e _ h l b ^ g u o i h k e _ ^ h \ Z l _ e v g h k l f b l h o h g ^ j b Z e v g h] h] _ g Z *COX2* \ B k i Z g b b , \ b ^ b f h , f m k m s _ k l \ m _ l w d h e h] b q _ k d b [e _ ^ g Z y i h i m e y p b y ^ Z

A : D E X Q ? G B ?

J h ^ *Kluyveromyces* \ g Z k l h y s _ \ j _ f y \ d e x q Z _ l i y l v \ b ^ h \ ] b [j b ^ b a b j m x s b o k y *K. lactis, K. marxianus, K. dobzhanskii, K. wickerhamii* b l Z d k h g h f b q _ k d b h l ^ Z e _ g g u _ *K. aestuarii, K. nonfermentas* (Kurtzman, 2003). K h \ j _ f _ g g Z y k b k l _ f Z l b d Z ^ j h ` ` _ c *Kluyveromyces* h k g h \ Z g Z g Z k m l y [b h e h] b q _ k d b o d j b l _ j b y o b ^ Z j Z a j Z [h l Z g Z g Z l m j Z e v g u o

Родственные виды *K. lactis, K. marxianus, K. dobzhanskii* и *K. wickerhamii* могут скрещиваться в любых комбинациях, очевидно, обладая общей системой типов спаривания (Johannsen, van der Walt, 1978; Johannsen, 1980; Naumov, Naumova, 2002).

Проведенный нами филогенетический анализ различных зон рДНК и ядерного гена *ACT1* подтвердил генетическое родство гибридизируемых видов *K. lactis, K. marxianus, K. dobzhanskii* и *K. wickerhamii*. С помощью пульс-электрофореза интактной хромосомной ДНК проведено сравнение геномов указанных видов. Установлено, что гаплоидное число хромосом видов *K. marxianus, K. dobzhanskii* и *K. wickerhamii,* равно восьми, а у *K. lactis* – шести. Пределы размеров хромосом существенно различаются у четырех видов, что позволяет дифференцировать их друг от друга по кариотипическим профилям.

На материале штаммов различного экологического и географического происхождения проведено изучение внутривидового разнообразия дрожжей *K. lactis, K. marxianus, K. dobzhanskii* и *K. wickerhamii.* Впервые в исследование включены наряду с культурными молочными дрожжами дикие природные изоляты, а также дрожжи *K. dobzhanskii* и *K. wickerhamii*, обитающие исключительно в природе.

Разделение вида *K. lactis* на две разновидности *K. lactis* var. *lactis* и *K. lactis* var. *drosophilarum* (Sidenberg, Lachance, 1986) основано на физиологических и экологических особенностях дрожжей; к последней разновидности относятся штаммы, неспособные ферментировать лактозу. Проведенный нами молекулярный анализ штаммов *K. lactis* различного происхождения выявил недостаточность существующей классификации. На основании рестриктазного анализа IGS2-района ДНК, секвенирования внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1/ITS2 и молекулярного кариотипирования обнаружена значительная генетическая гетерогенность таксономической разновидности *K. lactis* var. *drosophilarum*, которая включает девять генетических популяций: Западной Европе (“krassilnikovii”), Средней Азии (“среднеазиатская”), Южной Африке (“vanudenii”), Дальневосточной (“восточная”), пять в Северной Америке (собственно разновидность var. *drosophilarum,* “phaseolosporus”, “pseudovanudenii”, “новая” и “водная”). У штаммов указанных популяций обнаружены уникальные замены в 616 позиции 5.8S-ITS-последовательности ДНК (по нумерации типовой культуры *K. lactis* var. *lactis* BKM Y-868). Обнаруженные популяции имеют различную степень генетического родства. Согласно филогенетическому анализу нуклеотидных последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 наиболее дивергентными являются популяции “восточная” и “водная”, тогда как популяции “krassilnikovii”, “vanudenii” и “среднеазиатская” генетически близки к молочным дрожжам *K. lactis* var. *lactis.*

GZfbh[gZjm`_fghue_dmeyjfgZuj d_,juiha\heyxs^bb_nn_j_gpbjh\Zlv rlZffuihke_^gjb_oihimeyphdfch ehqg^ujdh``_*K. lactis* var. *lactis*.

Mkl Zgh\e_q lghhb^ *K. dobzhanskii* ij_^klZ\e_ij_gfy]_h]jZnbq_kdbfb ihimeypbb(y_f\bjhi_ck, dkh_c _jhZf_jbdZ bg^kZdehcg_\hk), h qgh hcju_ hlebqZxlkky IPJ-ijhnbeyfk ijZcf_jhf(GTG)$_5$, Z lZd`_ih ihke_^h\Zl_evgh kllyf ggljbZ gkdjb[bjm_kfu_ok_jhITS1/ITS2 b fblhohg^jbZe_v_g gZCOX2. Kh]eZkfgh he_dmeyjgd Zjfbhlbibjh\Zgbx kjZ\gbl_evghfmZgZebam gmde_hlb^guoihke_^h\Zl_evghkl fblhohg^jbZev]_gh]ZCOX2 \ BkiZgbb ih\b^bfh, fmkms_kl\m_l wdheh]bq_kk[dh kh[e_g gkZ y[ihimeyppbb y]h\b^.Z < hlebqbh_l k__jhZf_jbdZ^gjkhdb_oK. *lactis* var. *drosophilarum* khhl_lkl\mxsZy ihimeypbK. y *wickerhamii,* _jhyl,ghy\ey_lk]y_g_lbq_k[bdfbh]_g.ghc Bamq_gbgZ_f_brlZffu bf_ebb^_glbqgfu_e_dmeyjgdZ_j bhlbibu ihoh`bd >JN-ijhnbeIGS2-jZchgj>GD.

< hlebqbhl_*K. dobzhanskii* b *K. lactis,* ^jh``b*K. marxianus* bf_xl ijZdlbq_kdb^b_glbqgu ke_^h\Zl_evghkljb ggljbZgkdjb[bjm_fuo ki_ck_jhITS1 b ITS2. Ijbq_, f _^bgbqggmde_hlb^gZ_f_, gu h[gZjm`_gu w_lhfjZchg j>GD, g_k\yaZgkuwdheh]bq_kdbebf ]_h]jZnbq_ikjdbfkoh`^_gbZ_fff h.\RlZffuK. *marxianus* agZqbl_evgh hlebqZxlkyumde_hlb^gkf_^h\Zl_evghk_lZ jbZ[_evjZhcjhgZ j>GD – f_`]_ggukoi_ck_jhIGS1 b IGS2 ki_ck_.jhh\h_^_ggu cfb dhfie_dkghe_dmeyjguZ (ka d_gbjh\ZgbhgIGS1/IGS2 j>GD, y^_jgh]]h_gZ*ACT1,* RAPD-IPJ k ijZcf_jhfOPA-11, fhe_dmeyjgh_ dZjbhlbibjh\Zgb eb l_jZlmj^ggui h ihebfhjnbafmbebaZpbb eZdlh(aGZmf 2006) k\b^_l_evklhm xgl_lbq_kgdhc ghjh^ghk^Zb *K. marxianus* bihahey^xbnn_j_gpbjhj\Zlhimey:pbb 1) "marxianus" – ijbjh^gudhkfhihebl^gjh``,b\dexqZly ihmdmevlmCBS 712; 2) "fragilis" – fhehqggZd`dhkfhihebl^gjh``bbdebgbq_kdbe_y3)u "wikenii" – wg^_fbq^gjh``bbaZedh]hevg_ujb_glZpbhgjhpo_kk\h\ X`ghcnjbd_

< ihke_^g]bh_^u\k_[hevr_ihy\ey_lkZy[hlh[h[gZjm`_gbb debgbq_kdbe ykhj_^bmevlmj^gjhb``_S. *cerevisiae* bh\hafh`ghc boiZlh]_gg.hlkhlbgh]bfhe_dmeyjfgZujd_jZdfebgbq_kdbe_yS.u *cerevisiae* ihoh`bgZi_dZjkdblZffu b, _jhyl,ghjhbkoh^hyllgbo (Hennequin et al., 2001; de Llanos et al., 2004). F_^bpbgkdlZf_fu\klj_qZxlky lZd`kj_^bb^hK. *lactis* bK. *marxianus.* Ijh_^_ggu cfbkjZ\gbl_evguc ZgZebkb^_l_evklhm[elbadh]f_g_lbq_kjdhm^fkl_fhehqgubo ]hkiblZevgZ fhh*Kluyveromyces*. <k_bamq_gdeub_gbq_kdbe_yilhu fgh]bffhe_dmeyjfgZujd_jZgf_hlebqZelbkrlZffh,\\u^_e_ggbuao fhehqgujh^md,lhb\lZd`_h[eZ^Zkeibh kh[ghkkv[jxZ`b\ZevZ dlh.ham

Ассоциации дрожжей, сбраживающих лактозу, с молочными продуктами, и, следовательно, и с млекопитающими животными, делают их очевидными прародителями госпитальных штаммов. Следует отметить, что ряд характеристик, свойственных патогенным дрожжам, уже имеются у штаммов *K. marxianus* (популяция “fragilis”): образование псевдомицелия, устойчивость к повышенной температуре, высокая протеолитическая активность.

Полученные результаты позволили разработать систему молекулярной идентификации дрожжей рода *Kluyveromyces*. Для определения видовой принадлежности штаммов предложено использовать рестрикционный анализ рибосомальной ДНК – межгенного спейсера IGS2. Показана пригодность ПЦР-анализа с праймерами $(GTG)_5$, $(ATG)_5$ и OPA-11 для типирования отдельных штаммов и изучения внутривидового полиморфизма дрожжей *Kluyveromyces*.

ВЫВОДЫ

1. Разработана система молекулярной идентификации видов рода *Kluyveromyces* на основе рестрикционного анализа ПЦР-амплифицированного IGS2-участка генома. Предложено использовать RAPD-ПЦР с праймерами $(GTG)_5$, $(ATG)_5$ и OPA-11 для изучения внутривидового полиморфизма дрожжей *K. lactis*, *K. marxianus* и *K. dobzhanskii*.
2. Впервые проведен сравнительный анализ геномов гибридизируемых видов *Kluyveromyces*. Кариотипический анализ показал, что гаплоидные наборы хромосом видов *K. marxianus, K. wickerhamii* и *K. dobzhanskii* равны восьми, у *K. lactis* – шести.
3. Выявлены недостатки существующей классификации *K. lactis*, а именно разделение вида на две разновидности *K. lactis* var. *lactis* и *K. lactis* var. *drosophilarum*. На большом материале штаммов различного происхождения показана гетерогенность разновидности *K. lactis* var. *drosophilarum*, внутри которой дифференцировано девять генетических популяций: пять в Северной Америке (var. *drosophilarum*, “phaseolosporus”, “pseudovanudenii”, “новая” и “водная”), по одной в Европе (“krassilnikovii”), Средней Азии (“среднеазиатская”), Южной Африке (“vanudenii”) и в Дальневосточной Азии (“восточная”).
4. Обнаружено, что типовой вид рода *Kluyveromyces – K. marxianus* является генетически неоднородным и включает три дивергентные популяции: 1) собственно “marxianus” – природные космополитные дрожжи; 2) “fragilis” – молочные, также космополитные дрожжи, и клинические изоляты; 3) “wikenii” – эндемичные дрожжи из алкогольных ферментационных процессов Южной Африки.

5. Установлено, что по многим молекулярным маркерам клинические изоляты *K. lactis* и *K. marxianus* не отличаются от штаммов этих же видов, выделенных из молочных продуктов, и, очевидно, происходят от них.
6. Сравнительный молекулярный анализ выявил генетическую обособленность североамериканских популяций дрожжей *K. wickerhamii*.
7. Впервые проведено изучение популяционной структуры дрожжей *K. dobzhanskii*. Показано, что этот вид включает по крайней мере три географические популяции (европейскую, североамериканскую и дальневосточную), отличающиеся по нуклеотидным последовательностям района ITS1/ITS2 рДНК и митохондриального гена *COX2*, а также ПЦР-профилям с праймером $(GTG)_5$.
8. Создана большая коллекция штаммов различных видов *Kluyveromyces*, охарактеризованная молекулярными методами.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Naumova E.S., Sukhotina N.N., Naumov G.I. Molecular-genetic differentiation of the *Kluyveromyces lactis* and its closest wild relatives // FEMS Yeast Research. 2004. V.5. P. 263–296.
2. 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. № 13. С. 387–393.
3. Сухотина Н.Н., Наумова Е.С., Наумов Г.И. Молекулярный полиморфизм дрожжей *Kluyveromyces dobzhanskii:* географические популяции // ДАН. 2006. Т. 409. № 5. С. 694–698.
4. Наумов Г.И., Сухотина Н.Н., Наумова Е.С. Новый генофонд для молочных дрожжей: молекулярно-генетическая дифференциация комплекса *Zygofabospora/Kluyveromyces lactis* // Материалы 2-го Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». 10-14 ноября 2003. Москва, Россия. С. 276.
5. Наумов Г.И., Сухотина Н.Н., Наумова Е.С. Молекулярно-генетический анализ происхождения госпитальных штаммов *Kluyveromyces/Zygofabospora marxiana* // Успехи медицинской микологии. – М. Национальная академия микологии. 2004. С. 8–9.
6. Наумов Г.И., Сухотина Н.Н., Наумова Е.С. Сравнительный молекулярно-генетический анализ госпитальных штаммов *Kluyveromyces lacis* // Успехи медицинской микологии. – М. Национальная академия микологии. 2005. Москва. С. 20–21.

7. K m o h l b G g Z G Z m f h ? \ K G Z m f h = B F h e _ d m e y] j _ g l Z y h] _ g g h k l v f h e h q g u ^ o h ` ` _ d *Kluyveromyces marxianus* // M k i _ o f b _ ^ b p b g k d h c f b d h e h .] = b f F. G Z p b h g Z e Z v d g Z Z ^ y _ f f b b y d h e h .] 2006. F h k d . \ K 21–22.
8. Naumov G.I., Naumova E.S., Sukhotina N.N. Complex composition of the yeast *Zygofabospora/Kluyveromyces lactis*: genetic and molecular differentiation of subpopulations // Abstracts of First FEMS Congress of European microbiologists. June 29-July 3. 2003. Slovenia. Ljubljana. P. 205.
9. Naumov G.I., Sukhotina N.N., Naumova E.S. Differentiation of dairy yeast *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* and its closest wild relatives from European population 'krassilnikovii' // Abstracts of XXIIth International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology. August 7-12th. 2005. Bratislava. Slovak Republic. Yeast. V. 22. S. 43.