

ПОЛИЩУК Л.В.[✉], ТКАЧЕНКО К.С., ФОМИНА М.А.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины,
Украина, 03143, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 154, e-mail: LVPolishchuk@ukr.net
[✉]LVPolishchuk@ukr.net, (066) 641-97-01

ХАРАКТЕРИСТИКА ITS-ФРАГМЕНТА рДНК *RHODOTORULA MUCILAGINOSA* ИЗ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ДОЛГОЖИТЕЛЯ

Традиционно дрожжи классифицировали по морфологическим, культуральным и физиологическим признакам с широким применением биохимических методов, основанных на ферментации и усвоении микроорганизмами ряда органических соединений, однако такие методы фенотипической таксономии требуют значительных затрат времени и труда. Кроме того, на подобные характеристики влияют условия и возраст дрожжевой культуры [1–5]. В современной идентификации дрожжей, наряду с другими микроорганизмами, повсеместно используются методические подходы, основанные на достижениях молекулярной биологии. Наиболее популярными являются методы, основанные на сравнительном анализе как консервативных, так и вариабельных нуклеотидных последовательностей рРНК-генов. Одной из наиболее часто используемой последовательности рибосомального оперона является так называемый фрагмент ITS (Internal Transcribed Spacer), состоящий из частичной последовательности рРНК-кластера, содержащей 5'-конец 18S рРНК-гена, ITS1, 5,8S рРНК-гена, ITS2, 3'-конец 28S рРНК-гена. Полученные данные используют для филогенетической характеристики микроэукариотов и построения дендрограмм, отражающих эволюцию изучаемых последовательностей ДНК, в нашем случае – рибосомальных генов [1–5].

В данной работе нами был проведен анализ особенностей первичной структуры ITS-фрагмента рибосомальной ДНК штамма красных дрожжей *Rhodotorula mucilaginosa* S1, выделенного из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) здорового долгожителя, в сравнении с известными гомологичными нуклеотидными последовательностями базидиомицетов.

Материалы и методы

Культура красных дрожжей была выделена в 2013 г. из дистального отдела желудочно-

кишечного тракта здорового гуцульского долгожителя из высокогорного района Карпат Украины [1, 7, 8]. Предварительное изучение морфологических и физиологических характеристик культуры показало ее принадлежность к отделу Basidiomycota, роду *Rhodotorula* [3, 6–9]. Кроме того, для детализации таксономического положения дрожжевой культуры ранее нами использовался *in silico* анализ полученной для нее нуклеотидной последовательности фрагмента ITS, содержащего 5'-конец 18S рРНК-гена, ITS1, 5,8S рРНК-гена, ITS2, 3'-конец 28S рРНК-гена хромосомы исследуемого организма. Для амплификации ITS фрагмента хромосомы были использованы универсальные грибные праймеры ITS1 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' и ITS4 5'-TCCTCCGTTATTGATATGC-3' [1, 8]. Нами была определена и опубликована в Интернет базе данных сервера NCBI «Nucleotide collection» с идентификационным номером KR779874 нуклеотидная последовательность ITS-фрагмента исследуемого штамма красных дрожжей *Rhodotorula mucilaginosa* isolate S1 [8]. ITS-фрагмент *Rhodotorula mucilaginosa* S1 (654 п. н.) использовали в данной работе в качестве реперной последовательности. В аналитической работе была использована Интернет-база данных сервера NCBI: «Nucleotide collection» [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>]. Был проведен анализ *in silico* части базы «Nucleotide collection», содержащей информацию о нуклеотидном строении ДНК грибов отдела Basidiomycota (taxid:5204). Изучение *in silico* этой базы данных проводилось с применением пакета программ этого же сервера BLAST: blastn и bl2seq [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]. В работе использовали базовые настройки программы BLAST без изменений.

Результаты и обсуждение

Поиск *in silico* последовательностей ДНК базидиомицетов, гомологичных по нуклеотид-

ному строению реперному фрагменту ITS, выявил 801 фрагмент с нулевым значением E-value, указывающим на максимальную достоверную гомологию этих последовательностей. Они являлись аналогичными фрагментами рРНК-кластеров базидиомицетов, содержащими 5'-концы 18S рРНК-генов, ITS1, 5,8S рРНК-генов, ITS2, 3'-концы 28S рРНК-генов, и имели значительную степень идентичности (> 85 %) своего первичного строения таковому реперной последовательности. Гомологичные реперному ITS-фрагменту последовательности были выявлены в основном у представителей семейства Sporidiobolaceae порядка Sporidiobolales. Последовательности были идентифицированы у дрожжей, отнесенных к родам *Rhodotorula*, которые считаются анаморфами рода *Rhodospiridium*, и родам *Sporobolomyces*, которые считаются анаморфами рода *Sporidiobolus*.

Как известно, полный цикл развития дрожжевого организма (голоморфа) может включать две различные формы: анаморфы и телеоморфы [3]. Анаморфа – это стадия бесполого размножения гриба, отличающаяся морфологически и кариологически от совершенной половой стадии – телеоморфы. Анаморфы и телеоморфы грибов исторически описывались как самостоятельные виды и имеют бинаминальные названия. Представители родов *Rhodotorula* и *Rhodospiridium* могут включать различные стадии развития одних и тех же базидиомицетных грибов, и в настоящее время для некоторых из них родовые названия приводятся как синонимичные. Сходная ситуация существует и с представителями родов *Sporobolomyces* и *Sporidiobolus*. Большинство идентичных реперной последовательностей из общего числа отобранных (60,9 %) обнаружены у 488 видов рода *Rhodotorula* (*R. mucilaginosa*, *R. glutinis*, *R. sphaerocarpus*, *R. graminis*, *R. dairenensis*, *Rhodotorula* sp.). Из них 59,4 % были штаммы вида *Rhodotorula mucilaginosa* (290 штамм). Также было выявлено наличие идентичных последовательностей у организмов, принадлежащих к родам *Rhodospiridium* (25,7 %), *Sporobolomyces* (2,6 %), *Sporidiobolus* (1,6 %). Таким образом, около 87 % последовательностей, идентичных реперному ITS-фрагменту, было обнаружено для родов *Rhodotorula* и *Rhodospiridium*, по всей видимости, представляющих ана- и телеоморфы одних и тех же организмов.

В таблице представлены результаты парного выравнивания гомологичных последовательностей аналогичных фрагментов рРНК-кластеров штаммов *Rhodotorula mucilaginosa* с наибольшей степенью гомологии реперному ITS-фрагменту. Представленные последовательности имеют молекулярный размер 609–2359 п. н. Степень идентичности первичного строения этих последовательностей была очень высокой – более 99,7 %. Соответственно полученным данным, ITS-последовательность исследуемой культуры красных дрожжей идентична на 99,9–100 % строению аналогичных фрагментов ДНК типовых штаммов из коллекции ATCC. Наименьшая степень перекрытия (95,1 %) показана для глубоководных дрожжей *Rhodotorula*, выделенных из проб воды Тихого океана (SY-88 и SY-55) [4]. Культура дрожжей-родоторул из коллекции ISNAM (UOA/HCPF 12626) имела степень перекрытия 97,8 % фрагментов рРНК-кластеров [2]. Для ряда культур дрожжей показано наличие от одного до трех несовпадений нуклеотидных оснований (mismatches) или/и одного-двух разрывов (gaps). Наибольшее количество несоответствий оснований в первичном строении фрагментов рРНК-кластеров было выявлено у штамма *Rhodotorula mucilaginosa* MG13, выделенного из образцов почвы, взятых на кофейных плантациях Бразилии. Максимальная степень подобия гомологичных фрагментов последовательностей рРНК-кластеров и реперного ITS-фрагмента исследуемой культуры выявлена у 4-ех штаммов *R. mucilaginosa*, а именно: 100 %-ная идентичность перекрытия фрагментов в 654 п. н. последовательностей у 3-ех штаммов *R. mucilaginosa* из коллекции ISHAM (PMM08-1716L, PMM08-3942L, PMM08-3684L) и несколько меньшая степень идентичности (99,8 %) у фрагмента в 654 п. н. у штамма *R. mucilaginosa* DSM 18184 из коллекции DSMZ [2]. Фрагменты рРНК-кластеров нескольких штаммов *R. mucilaginosa* (ATCC 4054, ANT 12-058, UOA/HCPF 10538) с меньшей степенью (93,1–97,8 %) перекрытия последовательности ввиду меньшего молекулярного размера их ITS-фрагментов были полностью идентичны реперному ITS-фрагменту. Таким образом, наиболее гомологичными реперному ITS-фрагменту *R. mucilaginosa* S1 оказались также выделенные из организма человека и животных штаммы *R. mucilaginosa* PMM08-1716L, 3942L и 3684L из коллекции ISHAM.

Таблица. Характеристика последовательностей ITS родоторул, гомологичных реперному ITS-фрагменту *R. mucilaginosa*

Культуры <i>R. mucilaginosa</i> с наибольшим соответствием		Критерии гомологии ITS-фрагментов		Источник выделения культур дрожжей (коллекция)
Штаммы родоторул	Номер в GenBank	перекрытие, п. н.	идентичность, %	
PMM08-1716L	KP132583 (682 п.н.) [*]	654/654 ^{**}	100 (0/0) ^{***}	человек и животные, Франция (ISHAM)
PMM08-3942L	KP132585 (682 п.н.)	654/654	100 (0/0)	человек и животные, Франция (ISHAM)
PMM08-3684L	KP132584 (682 п.н.)	654/654	100 (0/0)	человек и животные, Франция (ISHAM)
ATCC 4054	KC881069 (609 п.н.)	609/609	100 (0/0)	типичный штамм, США (ATCC)
ANT 12-058	KM822749 (639 п.н.)	638/638	100 (0/0)	ледниковые воды, Антарктика
PG294	AB916512 (623 п.н.)	622/623	100 (0/1)	оперение птиц, Норвегия
IA32	KM246206 (639 п.н.)	638/640	100 (0/2)	сельскохозяйственные культуры, Бразилия
UOA/HCPF 10538	HQ702343 (640 п.н.)	640/640	100 (0/0)	человек и животные, Греция (ISHAM)
ATCC 4056	KC881070 (609 п.н.)	608/609	99,8 (1/0)	типичный штамм, США (ATCC)
DSM 18184	DQ386306 (2359 п.н.)	653/654	99,8 (1/0)	сточные воды, Германия (DSMZ)
MG13	KM246213 (637 п.н.)	635/640	99,7 (1/2)	сельскохозяйственные культуры, Бразилия
goayan1wei2	EF192223 (643 п.н.)	637/641	99,5 (3/1)	морская среда, Китай
UOA/HCPF 12626	KC254074 (2359 п.н.)	640/640	99,8 (1/0)	человек и животные, Греция (ISHAM)
SY-88	AB025998 (702 п.н.)	622/623	99,8 (0/1)	глубоководная среда, Тихий океан

Примечания: * – молекулярный размер ITS-фрагмента; ** – перекрытие ITS-фрагмента GenBank/реперного ITS-фрагмента; *** – соотношение количества несоответствий нуклеотидных оснований к разрывам между ними.

В результате проведенных исследований *in silico* определено расположение несовпадений нуклеотидных оснований ITS исследуемого изолята *R. mucilaginosa* S1 и представленных в базе данных GenBank последовательностей ITS 293-ех штаммов вида *R. mucilaginosa*, показавших E-value = 0 в выравниваниях. Наиболее часто были выявлены несовпадения нуклеотидных остатков в положениях 129 (C), 158 (A) и 541 (C) последовательности ITS-фрагментов штаммов *R. mucilaginosa* (рис. 1).

Установлено, что 541-у нуклеотидному остатку (C) ITS-фрагмента изолированного нами штамма *R. mucilaginosa* S1 соответствует

тиминный остаток более, чем у 85 % ITS-фрагментов штаммов вида *R. mucilaginosa*. Было также обнаружено, что для 26 % штаммов вида *R. mucilaginosa* 129-ому нуклеотидному остатку (C) реперного ITS-фрагмента соответствует тиминный остаток, а 158-ому адениновому – гуанидиновый.

Для определения локализации в структурных элементах рРНК-кластера генов (рРНК-генах или спейсерах), наиболее часто встречающихся негомологичных нуклеотидных остатков в положениях 129, 158 и 541 последовательности реперного ITS-фрагмента, было проведено попарное выравнивание двух ITS-

фрагментов: исследованного штамма *R. mucilaginosa* S1 (KR779874, 654 п. н.) и максимально идентичного реперному ITS-фрагменту штамма *R. mucilaginosa* PMM08-1716L (KP132583, 682 п. н.) (рис. 2). Анализ *in silico* показал идентичность первого нуклеотидного остатка реперного ITS-фрагмента штамма *R. mucilaginosa* S1 де-

вятнадцатому нуклеотидному остатку *R. mucilaginosa* PMM08-1716L. Наши исследования показали, что нуклеотидные остатки в положениях 129, 158 и 541 локализируются в спейсерных областях ITS-фрагмента штамма *R. mucilaginosa* S1: 129-й и 158-й нуклеотидные остатки – в ITS1, а 541-й – в ITS2 (рис. 2).

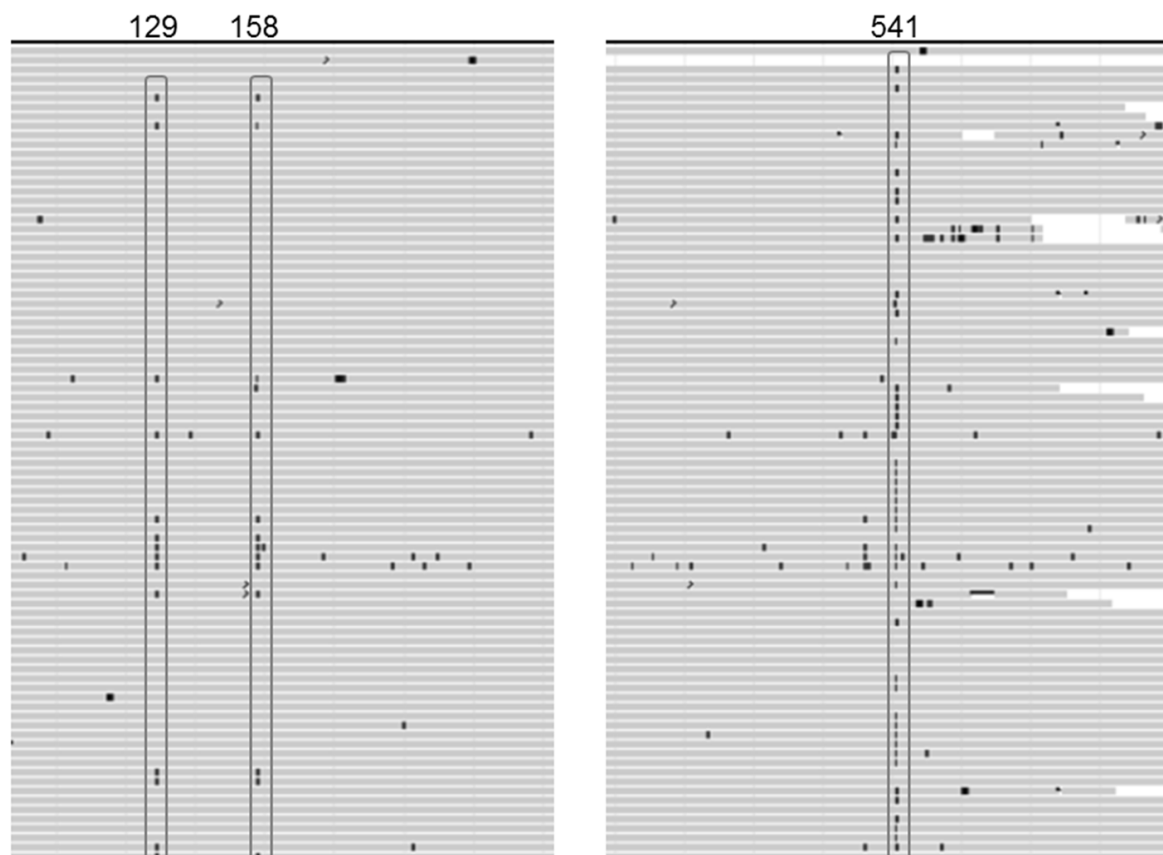


Рис. 1. Расположение несовпадений нуклеотидных оснований ITS-фрагментов исследуемого изолята *R. mucilaginosa* S1 и штаммов *R. mucilaginosa* (GenBank).

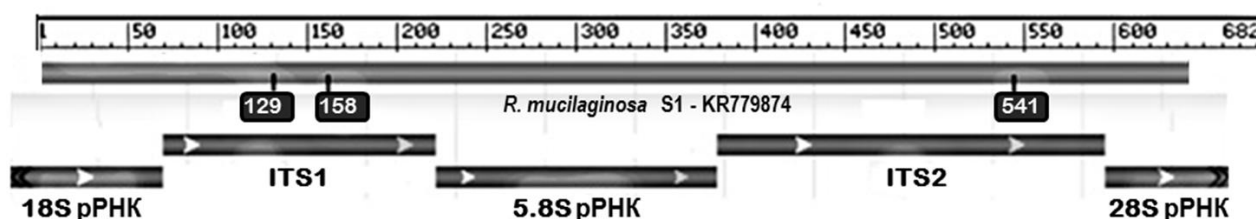


Рис. 2. Расположение несовпадений нуклеотидных оснований ITS-фрагмента *R. mucilaginosa* S1 на структурных элементах ITS-фрагмента штамма *R. mucilaginosa* PMM08-1716L.

Выводы

Таким образом, в результате проведенного анализа особенностей первичной структуры ITS-фрагмента рибосомальной ДНК исследованного штамма красных дрожжей *Rhodotorula mucilaginosa* S1, выделенного из ЖКТ здорового

долгожителя, в сравнении с известными гомологичными нуклеотидными последовательностями базидиомицетов было установлено, что 100 %-ная гомология наблюдалась для штаммов *R. mucilaginosa* PMM08-1716L, 3942L и 3684L из коллекции ISHAM, которые также были вы-

делены из организма человека и животных, и выявлены наиболее часто встречающиеся несовпадения нуклеотидных остатков в положе-

ниях 129, 158 и 541, локализованные в спейсерных областях ITS-фрагмента рибосомального оперона.

Литература

1. Hong J.W., Fomina M., Gadd G.M. F-RISA fungal clones as potential bioindicators of organic and metal contamination in soil // *J. Appl. Microbiol.* – 2010. – V. 109, № 2. – P. 415–430. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04665.x.
2. Irinyi L., Serena C., Garcia-Hermoso D. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database – the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi // *Medical Mycology.* – 2015. – V. 53, № 4. – P. 313–337. doi: 10.1093/mmy/myv008.
3. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. *The Yeasts: A Taxonomic Study.* – Amsterdam – Oxford: Elsevier, 2011. – 1053 p.
4. Nagahama T., Hamamoto M., Nakase T., Takami H., Horikoshi K. Distribution and identification of red yeasts in deep-sea environments around the northwest Pacific Ocean // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 2001. – V. 80, № 2. – P. 101–110. doi: 10.1023/A:1012270503751.
5. Zimmer C., Platz T., Cadez N., Giffhorn F., Kohring G.W. A cold active (2R,3R)-(-)-di-O-benzoyl-tartrate hydrolyzing esterase from *Rhodotorula mucilaginosa* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – V. 73, № 1. – P. 132–140. doi: 10.1007/s00253-006-0463-x.
6. Бабьева И.П., Голубев В.И. Методы выделения и идентификации дрожжей. – М.: «Пищевая промышленность», 1979. – 118 с.
7. Квасников Е.И., Васкивнюк В.Т., Суденко В.И., Гринберг Т.А. Каротин-синтезирующие дрожжи. – К.: Наукова думка, 1980. – 171 с.
8. Fomina M.A., Polishchuk L.V., Tkachenko K.S., Hong J.W., Zelena L.B., Ianieva O.D., Pidgorskyi V.S. Complex identification of red yeast isolate from gastrointestinal tract of Hucul long-liver (Carpathians, Ukraine) // *Мікроб. журнал.* – 2016. – Т. 78, № 5. – С. 2–11.
9. Buzzini P., Innocenti M., Turchetti B., Libkind D., van Broock M., Mulinacci N. Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces* and *Sporidiobolus* // *Can. J. Microbiol.* – 2007. – V. 53, № 8. – P. 1024–1031. doi: 10.1139/W07-068.

POLISHCHUK L.V., TKACHENKO K.S., FOMINA M.A.

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Acad. Zabolotnoho str., 154, e-mail: LVPolishchuk@ukr.net

CHARACTERISTIC OF ITS FRAGMENT OF rDNA OF *RHODOTORULA MUCILAGINOSA* ISOLATED FROM GASTROINTESTINAL TRACT OF CENTENARIAN

Aim. The aim of the work was to analyse the primary structure of the ITS region of the ribosomal operon of the red yeast isolate *Rhodotorula mucilaginosa* S1 from the gastrointestinal tract of healthy centenarian compared to the available homological basidiomycetous nucleotide sequences. **Methods.** *In silico* comparison of the ITS nucleotide sequences using NCBI server resources (BLAST programs and "Nucleotide" database) with the reference ITS-fragment of red yeast isolate was performed. **Results.** Almost 90 % of highly homologous to the reference ITS-fragment out of 800 selected sequences represented genera *Rhodotorula* и *Rhodospiridium* with the top hits for *R. mucilaginosa* strains PMM08-1716L, 3942L and 3684L. The most frequent nucleobases mismatches of ITS-fragments of GenBank's *R. mucilaginosa* strains compared to the reference one were observed in the positions 541 (T/C) for 85 % of strains, and 129 (T/C) and 158 (G/A) for 26 % of strains. **Conclusions.** The primary structure of studied ITS region showed 100 % homology to *R. mucilaginosa* strains also isolated from humans and animals, as well as the most frequently mismatches for 129th, 158th и 541st nucleotides located in the spacers regions of the ribosomal operon.

Keywords: ITS, rDNA, nucleotide sequence, red yeast, human GIT.