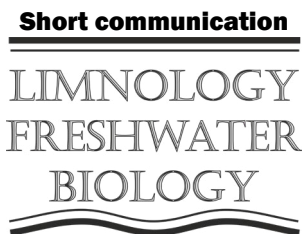


Molecular-genetic features of ascomycetous yeast *Kluyveromyces* from aquatic ecosystems



Naumova E.S.*, Tuaeva A.Yu., Lyutova L.V.

National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, 123098 Russia

ABSTRACT. Using genetic hybridization and phylogenetic analyses, the genetic relationship of terrestrial and aquatic species of the ascomycetous yeast genus *Kluyveromyces* was investigated. The results obtained allow us to conclude that aquatic (*K. aestuarii*, *K. nonfermentans*, and *K. siamensis*) and terrestrial (*K. lactis*, *K. marxianus*, *K. dobzhanskii*, *K. starmeri*, *K. wickerhamii*) species belong to different genetic genera.

Keywords: species of the genus *Kluyveromyces*, interspecies hybridization, genetic genus, biological species, phylogenetic analysis

For citation: Naumova E.S., Tuaeva A.Yu., Lyutova L.V. Molecular-genetic features of ascomycetous yeast *Kluyveromyces* from aquatic ecosystems // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 1026-1031. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1026

1. Introduction

The genus *Kluyveromyces* includes eight species: terrestrial *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. dobzhanskii*, *K. starmeri* and *K. wickerhamii*, as well as aquatic *K. aestuarii*, *K. nonfermentans* and *K. siamensis* (Lachance, 2011; Freitas et al., 2020). Terrestrial species are cosmopolitan and are found in different regions of the world, while aquatic species have a limited habitat and are isolated primarily from mangrove forests in Taiwan, China, Thailand and Brazil, as well as from seawater in the United States. We have previously shown that the terrestrial species *K. lactis* and *K. marxianus* have a common system of mating types and can be crossed (Naumov and Naumova, 2002; Naumova et al., 2004). Aquatic species have not been studied using genetic methods. The purpose of this work was to study interspecific hybridization of terrestrial and aquatic species of the genus *Kluyveromyces*.

2. Materials and methods

We investigated the type cultures of the species *K. lactis* CBS 683 (cheese, UK), *K. dobzhanskii* CBS 2104, (*Drosophila pseudoobscura*, USA), *K. marxianus* CBS 712 (Europe), *K. wickerhamii* CBS 2745 (*Drosophila* sp., USA), *K. aestuarii* CBS 4438 (estuary, USA), *K. nonfermentans* CBS 8778 (seawater, Japan) and *K. siamensis* CBS 10860 (mangrove water, Thailand). In addition,

natural strains of *K. lactis* UCDFST 71-45 and CBS 6169, isolated from a swamp in Louisiana (USA) were also used (Naumova et al., 2004). Conditions for yeast cultivation, nutrient media, and primers used for amplification of the D1/D2 domain of 26S rDNA, ITS region, translation elongation factor EF-1 α , and the *ACT1* gene were published previously (Lyutova et al., 2022). The polymerase chain reaction was carried out using a Bio-Rad DNA amplifier (USA). The nucleotide sequence of two-strand PCR products was determined by direct sequencing using the Sanger method on an Applied Biosystems 3730 automatic sequencer (USA). A search for similarities with known nucleotide sequences of the corresponding genes and rDNA was carried out using the BLAST program in GenBank. Phylogenetic trees were constructed using the neighbor joining method in the MEGA 7 software.

3. Results and discussion

To study the genetic relationship of terrestrial and aquatic species of *Kluyveromyces*, a selective hybridization method developed in our laboratory was used (Naumov and Naumova, 2002). Auxotrophic mutations were induced in *K. lactis*, *K. dobzhanskii*, *K. marxianus*, and *K. wickerhamii* strains using UV irradiation. *K. lactis* strain CBS 683, marked by the *lys1* mutation, was used as a terrestrial tester. This strain is also able to grow on maltose. Additionally, an aux-

*Corresponding author.

E-mail address: lenna.naumova@yahoo.com (E.S. Naumova)

Received: June 01, 2024; Accepted: June 15, 2024;

Available online: August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



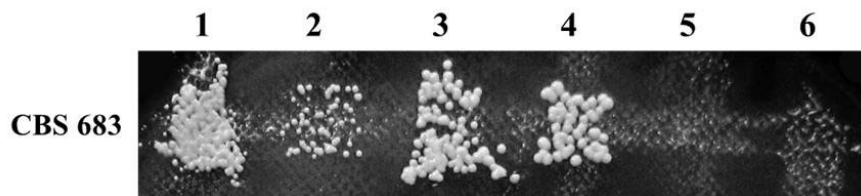


Fig.1. Hybridization of auxotrophic mutants of *Kluyveromyces* species in accordance with prototrophic growth on minimal medium at the sites of intersection of parental strains. Yeast replica: 1 – *K. lactis* UCDFST 71-45 (*ade4*); 2 – *K. dobzhanskii* CBS 2104 (*ura3*); 3 – *K. marxianus* CBS 712 (*trp2*); 4 – *K. wickerhamii* CBS 2745 (*ura3*); 5 – *K. aestuarii* CBS 4438 (*mal*); 6 – *K. siamensis* CBS 10860 (*mal*). The auxotrophic mutants used are given in parentheses. *K. lactis* type strain CBS 683 (*lys1*) was used as a tester.

otrophic mutant of the aquatic strain *K. lactis* UCDFST 71-45 *ade4* was employed. Strains of *K. dobzhanskii*, *K. marxianus*, and *K. wickerhamii* were marked by *ura3*, *trp2*, and *ura3* auxotrophic mutations, respectively. For genetic hybridization, we used prototrophic cultures of *K. aestuarii* and *K. siamensis*, which do not utilize maltose and, accordingly, cannot grow on a minimal medium with maltose.

Interspecific hybrids were obtained on minimal maltose medium (Fig. 1). Hybrids were recorded only between the terrestrial species *K. lactis*, *K. dobzhanskii*, *K. marxianus* and *K. wickerhamii* (Fig. 1, lanes 1–4). On the other hand, *K. aestuarii* and *K. siamensis* did not form hybrids with the *K. lactis* CBS 683 *lys1* tester (lanes 5 and 6).

To establish the phylogenetic relationship of the strains studied, we conducted a comparative analysis of the nucleotide sequences of the D1/D2 domain, ITS region, *EF-1α* and *ACT1* genes, which are universal molecular markers for yeast DNA barcoding (Fig. 2).

On the phylogenetic tree, the eight species of the genus *Kluyveromyces* formed a separate cluster with 100% bootstrap support, which, in turn, is divided into two subclusters. The first includes the terrestrial species *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. dobzhanskii*, *K. wickerhamii* and *K. starmeri*. Strains UCDFST 71-45 and CBS 6169 differed significantly from the type culture CBS 683 in the nucleotide sequences of the ITS region (7

substitutions), as well as the *EF-1α* (4) and *ACT1* (13) genes. Although the UCDFST 71-45 × CBS 683 hybrid had low ascospore viability (6%), meiotic segregation of control markers was regular. On the other hand, hybrids between the CBS 683 tester and the type cultures of *K. dobzhanskii*, *K. marxianus* and *K. wickerhamii* were completely sterile.

The second subcluster consists of aquatic species *K. aestuarii*, *K. nonfermentans* and *K. siamensis*, which did not form hybrids with the type culture *K. lactis* CBS 683.

4. Conclusion

The results of genetic hybridization and phylogenetic analyses indicate that aquatic and terrestrial *Kluyveromyces* species belong to different genetic genera. Species of the same genetic genus of ascomycetous fungi have a common system of mating types that allows them to cross in any combination (Naumov, 1979). Genetic genera include biological species that have postzygotic isolation and form nonviable meiotic products (ascospores) of hybrids with each other. According to the results, the strains isolated from a swamp in Louisiana represent a divergent population of the yeast *K. lactis*.

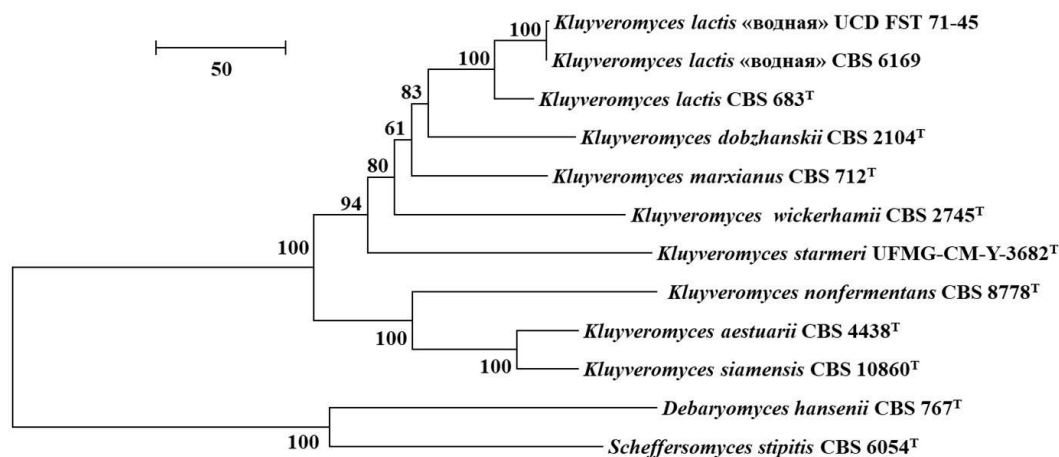


Fig.2. Multigene phylogenetic analysis of the genetic relationship of terrestrial and aquatic species of the genus *Kluyveromyces*. Bootstrap values > 50% are given. The tree is scaled to the number of substitutions. The type cultures of *Debaryomyces hansenii* CBS 767 and *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 were used as outgroup. T, type culture.

Acknowledgements

The study was carried out in the frame of the state assignment of the National Research Center “Kurchatov Institute”.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Freitas L.F.D., Batista T.M., Santos A.R.O. et al. 2020. Yeast communities associated with cacti in Brazil and the description of *Kluyveromyces starmeri* sp. nov. based on phylogenomic analyses. *Yeast* 37: 1–13. DOI: [10.1002/yea.3528](https://doi.org/10.1002/yea.3528)

Lachance M.-A. 2011. *Kluyveromyces* van der Walt (1971). In: C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Amsterdam: pp. 471–482.

Lyutova L.V., Naumov G.I., Shnyreva A.V. et al. 2022. Intraspecific polymorphism of the yeast *Kluyveromyces lactis*: genetic populations. *Microbiology* 91: 421–431. DOI: [10.1134/S0026261722300191](https://doi.org/10.1134/S0026261722300191)

Naumov G.I. 1979. Genetic concept of genus in fungi. *Doklady Biological Sciences* 241: 345–347.

Naumov G.I., Naumova E.S. 2002. Five new combinations in the yeast genus *Zygothospora* Kudriavzev emend. G. Naumov (pro parte *Kluyveromyces*) based on genetic data. *FEMS Yeast Research* 2: 39–46. DOI: [10.1111/j.1567-1364.2002.tb00067.x](https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00067.x)

Naumova E.S., Sukhotina N.N., Naumov G.I. 2004. Molecular-genetic differentiation on the dairy yeast *Kluyveromyces lactis* and its closest wild relatives. *FEMS Yeast Research* 5: 263–269. DOI: [10.1016/j.femsyr.2004.08.006](https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.08.006)

Молекулярно-генетические особенности аскомицетовых дрожжей *Kluveromyces* из водных экосистем

Краткое сообщение

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGY

Наумова Е.С.*, Туаева А.Ю., Лютова Л.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

АННОТАЦИЯ. С помощью гибридологического и филогенетического анализов изучено генетическое родство наземных и водных видов аскомицетового рода дрожжей *Kluveromyces*. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что водные (*K. aestuarii*, *K. nonfermentans*, и *K. siamensis*) и наземные (*K. lactis*, *K. marxianus*, *K. dobzhanskii*, *K. starmeri*, *K. wickerhamii*) виды относятся к разным генетическим родам.

Ключевые слова: виды рода *Kluveromyces*, межвидовая гибридизация, генетический род, биологические виды, филогенетический анализ

Для цитирования: Наумова Е.С., Туаева А.Ю., Лютова Л.В. Молекулярно-генетические особенности аскомицетовых дрожжей *Kluveromyces* из водных экосистем // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 1026-1031. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1026

1. Введение

Род *Kluveromyces* включает восемь видов: наземные *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. dobzhanskii*, *K. starmeri* и *K. wickerhamii*, а также водные *K. aestuarii*, *K. nonfermentans* и *K. siamensis* (Lachance, 2011; Freitas et al., 2020). Наземные виды космополитны и встречаются в разных регионах мира, тогда как водные виды имеют ограниченный ареал обитания и выделяются преимущественно из мангровых зарослей на Тайване, в Китае, Тайланде и Бразилии, а также из морской воды в США. Ранее нами было показано, что наземные виды *K. lactis* и *K. marxianus* имеют общую систему типов спаривания и могут скрещиваться между (Naumov and Naumova, 2002; Naumova et al., 2004). Водные виды генетическими методами не изучались. Целью данной работы было изучение межвидовой гибридизации наземных и водных видов рода *Kluveromyces*.

2. Материалы и методы

Объектом исследования служили типовые культуры видов *K. lactis* CBS 683 (сыр, Великобритания), *K. dobzhanskii* CBS 2104, (*Drosophila pseudoobscura*, США), *K. marxianus* CBS 712 (Европа), *K. wickerhamii* CBS 2745 (*Drosophila* sp., США), *K. aestuarii* CBS 4438 (эстуарий, США), *K. nonfermentans*

CBS 8778 (морская вода, Япония) и *K. siamensis* CBS 10860 (вода мангрового леса, Тайланд). Помимо типовой культуры *K. lactis*, были также использованы природные штаммы UCDFST 71-45 и CBS 6169, выделенные из болота в Луизиане (США) (Naumova et al., 2004). Условия культивирования дрожжей, питательные среды и использованные для амплификации домена D1/D2 26S рДНК, ITS-участка, фактора элонгации трансляции EF-1 α и гена *ACT1* праймеры опубликованы ранее (Лютова и др., 2022). Полимеразную цепную реакцию осуществляли на ДНК-амплификаторе “Bio-Rad” (США). Нуклеотидную последовательность ПЦР-продуктов по двум цепям определяли прямым секвенированием по методу Сэнгера на автоматическом секвенираторе “Applied Biosystems 3730” (США). Поиск сходства с известными нуклеотидными последовательностями соответствующих генов и рДНК проводили с помощью программы BLAST в GenBank. Филогенетические деревья строили методом объединения соседей в программе MEGA 7.

3. Результаты и обсуждение

Для изучения генетического родства наземных и водных видов *Kluveromyces* был применен разработанный в нашей лаборатории селективный метод гибридизации (Naumov and Naumova, 2002).

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: lena_naumova@yahoo.com (Е.С. Наумова)

Поступила: 01 июня 2024; Принята: 15 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



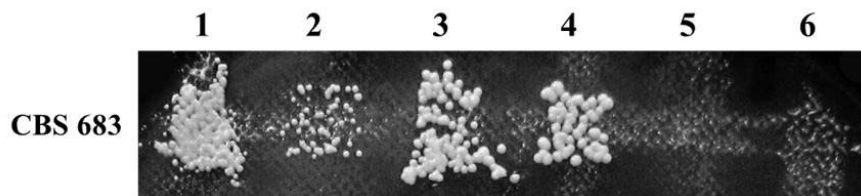


Рис.1. Гибридизация ауксотрофных мутантов видов рода *Kluyveromyces* согласно прототрофному росту на минимальной среде с мальтозой в местах пересечения родительских штаммов. Отпечатки дрожжей: 1 – *K. lactis* UCDFST 71-45 (*ade4*); 2 – *K. dobzhanskii* CBS 2104 (*ura3*); 3 – *K. marxianus* CBS 712 (*trp2*); 4 – *K. wickerhamii* CBS 2745 (*ura3*); 5 – *K. aestuarii* CBS 4438 (*mal*); 6 – *K. siamensis* CBS 10860 (*mal*). В скобках приводятся использованные ауксотрофные мутанты. Типовая культура *K. lactis* CBS 683 (*lys1*) была использована в качестве тестера.

С помощью УФ-облучения у штаммов *K. lactis*, *K. dobzhanskii*, *K. marxianus* и *K. wickerhamii* были индуцированы ауксотрофные мутации. Штамм *K. lactis* CBS 683, маркированный мутацией *lys1*, был использован в качестве наземного тестера. Этот штамм также способен расти на мальтозе. Дополнительно был использован ауксотрофный мутант водного штамма *K. lactis* UCDFST 71-45 *ade4*. Штаммы *K. dobzhanskii*, *K. marxianus*, и *K. wickerhamii* были маркированы ауксотрофными мутациями, соответственно, *ura3*, *trp2* и *ura3*. Для гибридизации были использованы прототрофные культуры дрожжей *K. aestuarii* и *K. siamensis*, которые не утилизируют мальтозу и, соответственно, не могут расти на минимальной среде с мальтозой.

Межвидовые гибриды получали на минимальной мальтозной среде (Рис. 1). Гибриды были зарегистрированы только между наземными видами *K. lactis*, *K. dobzhanskii*, *K. marxianus* и *K. wickerhamii* (Рис. 1, дорожки 1–4). С другой стороны, дрожжи *K. aestuarii* и *K. siamensis* не образовывали гибридов с тестером *K. lactis* CBS 683 *lys1* (дорожки 5 и 6).

Для установления филогенетического родства изученных штаммов мы провели сравнитель-

ный анализ нуклеотидных последовательностей домена D1/D2, ITS-участка, генов *EF-1a* и *ACT1*, которые являются универсальными молекулярными маркерами для баркодинга ДНК дрожжей (Рис. 2).

На филогенетическом древе виды рода *Kluyveromyces* со 100%-ной достоверностью сформировали отдельный кластер, который, в свою очередь, разделен на два субкластера. Первый включает наземные виды *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. dobzhanskii*, *K. wickerhamii* и *K. starmeri*. Штаммы UCDFST 71-45 и CBS 6169 существенно отличались от типовой культуры CBS 683 по нуклеотидным последовательностям ITS-участка (7 замен), а также генов *EF-1a* (4) и *ACT1* (13). Несмотря на то, что гибрид UCDFST 71-45 × CBS 683 имел низкую выживаемость аскоспор (6%), мейотическая сегрегация контрольных маркеров была регулярной. С другой стороны, гибриды между тестером CBS 683 и типовыми культурами *K. dobzhanskii*, *K. marxianus* и *K. wickerhamii* были полностью стерильными.

Второй субкластер сформировали водные виды *K. aestuarii*, *K. nonfermentans* и *K. siamensis*, которые не скрещивались с типовой культурой *K. lactis* CBS 683.

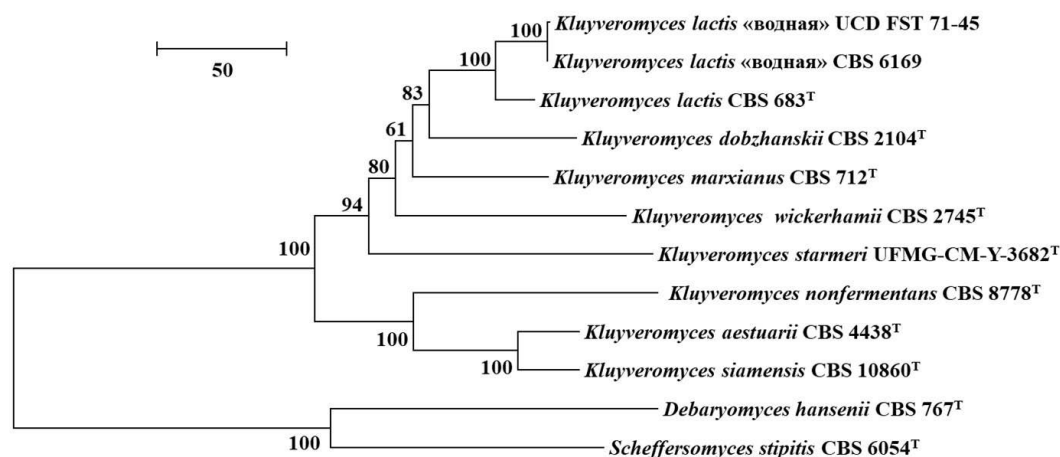


Рис.2. Мультигенный филогенетический анализ генетического родства наземных и водных видов рода *Kluyveromyces*. Приводятся значения бутстрепа >50%. Дерево масштабировано по количеству нуклеотидных замен. В качестве внешней группы использовали типовые культуры *Debaryomyces hansenii* CBS 767 и *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054. Т – типовая культура.

4. Заключение

Результаты гибридологического и филогенетического анализов указывают на то, что водные и наземные виды *Kluyveromyces* относятся к разным генетическим родам. Виды одного генетического рода аскомицетовых грибов обладают общей системой типов спаривания, позволяющей им скрещиваться в любой комбинации (Наумов, 1978). Генетические роды включают биологические виды, которые обладают постзиготической изоляцией и образуют между собой нежизнеспособные продукты мейоза (аскоспоры) гибридов. Согласно полученным результатам, выделенные из болота в Луизиане штаммы представляют собой дивергентную популяцию дрожжей *K. lactis*.

Благодарности

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Лютова Л.В., Наумов Г.И., Шнырёва А.В. и др. 2022. Внутривидовой полиморфизм дрожжей *Kluyveromyces lactis*: генетические популяции. *Микробиология* 91: 480–491. DOI: [10.31857/S002636562230019X](https://doi.org/10.31857/S002636562230019X)
- Наумов Г.И. 1978. Генетическая концепция рода у грибов. *Доклады Академии наук СССР* 241: 952–954.
- Freitas L.F.D., Batista T.M., Santos A.R.O. et al. 2020. Yeast communities associated with cacti in Brazil and the description of *Kluyveromyces starmeri* sp. nov. based on phylogenomic analyses. *Yeast* 37: 1–13. DOI: [10.1002/yea.3528](https://doi.org/10.1002/yea.3528)
- Lachance M.-A. 2011. *Kluyveromyces van der Walt* (1971). In: C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Amsterdam: pp. 471–482.
- Naumov G.I., Naumova E.S. 2002. Five new combinations in the yeast genus *Zygothospora* Kudriavzev emend. G. Naumov (pro parte *Kluyveromyces*) based on genetic data. *FEMS Yeast Research* 2: 39–46. DOI: [10.1111/j.1567-1364.2002.tb00067.x](https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00067.x)
- Naumova E.S., Sukhotina N.N., Naumov G.I. 2004. Molecular-genetic differentiation on the dairy yeast *Kluyveromyces lactis* and its closest wild relatives. *FEMS Yeast Research* 5: 263–269. DOI: [10.1016/j.femsyr.2004.08.006](https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.08.006)