

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ
Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

Дипломна магістерська робота

на тему: Біоінформатичний аналіз консервативних ділянок геномів
промислових видів дріжджів

Виконала: студентка 2 курсу, групи МГЗБТ-20

Спеціальності 162 Біотехнології та

біоінженерія освітньої програми

Біотехнологія високомолекулярних сполук

Маріанна ЯРМОЛЕНКО

Керівник: к.б.н. Ігор ГРЕЦЬКИЙ

Рецензент: к.б.н. Ольга ШИДЛОВСЬКА

Київ 2021

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ТЕХНОЛОГІЙ ТА
ДИЗАЙНУ

Факультет	<u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u>
Кафедра	<u>біотехнології, шкіри та хутра</u>
Спеціальність	<u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>
Освітня програма	<u>Біотехнологія високомолекулярних сполук</u>

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології, шкіри та хутра

д.т.н., проф. Олена МОКРОУСОВА

«__» _____ 20__ року

ЗАВДАННЯ
НА ДИПЛОМНУ МАГІСТЕРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНТУ
Ярмоленко Маріанни Володимирівни

1. Тема роботи: **Біоінформатичний аналіз консервативних ділянок геномів промислових видів дріжджів**

Науковий керівник роботи к.б.н. Ігор ГРЕЦЬКИЙ
затверджені наказом вищого навчального закладу від
«04» жовтня 2021 року №286.

2. Строк подання студентом роботи _____

3. Вихідні дані до роботи: завдання на дипломну магістерську роботу; наукова література щодо біоінформатичного аналізу геномів дріжджів; матеріали науково-дослідної та переддипломної практик.

4. Зміст дипломної роботи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи дослідження, експериментальна частина, висновки, список використаних джерел, додатки.

5. Консультанти розділів дипломної магістерської роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 1	Ігор ГРЕЦЬКИЙ, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Розділ 2	Ігор ГРЕЦЬКИЙ, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Розділ 3	Ігор ГРЕЦЬКИЙ, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		

6. Дата видачі завдання 04.10.2021.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів дипломної магістерської роботи	Терміни виконання етапів	Примітка про виконання
1	Вступ		
2	Розділ 1 Огляд літератури		
3	Розділ 2 Матеріали та методи дослідження		
4	Розділ 3 Експериментальна частина		
5	Висновки		
6	Оформлення дипломної магістерської роботи		
7	Подання дипломної магістерської роботи на кафедру для рецензування		
8	Перевірка дипломної магістерської роботи на наявність ознак плагіату		
9	Подання дипломної магістерської роботи у відділ магістратури для перевірки виконання індивідуального плану		
10	Подання дипломної магістерської роботи на затвердження завідувачу кафедри		

Студент _____

Маріанна ЯРМОЛЕНКО

Науковий керівник роботи _____

Ігор ГРЕЦЬКИЙ

Директор НМЦУПФ _____

Олена ГРИГОРЕВСЬКА

АНОТАЦІЯ

Маріанна ЯРМОЛЕНКО Біоінформатичний аналіз консервативних ділянок геномів промислових видів дріжджів .- Рукопис.

Дипломна магістерська робота за спеціальністю 162 – Біотехнологія та біоінженерія. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2021 рік.

В дипломній магістерській роботі розглянуті дані молекулярно-генетичних і біоінформатичних методів дослідження геномів дріжджів за для оцінки їх біотехнологічного потенціалу за допомогою генетичної ідентифікації.

Описані біоінформатичні методи дослідження геномів дріжджів для вивчення мікроеволюційного процесу шляхом порівняльного аналізу консервативних ділянок геному

Ключові слова: Дендрограми, молекулярно-філогенетичний аналіз, *Ascomycota*, *Basidiomycota*, ITS-послідовність.

ANNOTATION

Marianna YARMOLENKO Bioinformatics analysis of conservative genome regions of industrial yeast species.- Manuscript.

Master's thesis in specialty 162 - Biotechnology and Bioengineering. - Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2021.

In the master's thesis the data of molecular genetic and bioinformatics methods of research of yeast genomes for estimation of their biotechnological potential by means of genetic identification are considered.

Bioinformatics methods for studying yeast genomes for studying the microevolutionary process by comparative analysis of conserved regions of the genome are described

Key words: Dendrograms, molecular phylogenetic analysis, Ascomycota, Basidiomycota, ITS sequence.

ЗМІСТ

ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	11
1.1. Філогенетичний аналіз дріжджів	11
1.1.1 Філогенетичне розміщення аскоміцетних дріжджів	14
1.1.2 Філогенетичне розміщення дріжджів-базидіоміцетів	16
1.2. Видова ідентифікація дріжджів	18
Висновок до розділу 1.....	24
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	26
2.1. Характеристика об'єкту дослідження	26
2.2. Бази даних нуклеотидних послідовностей	26
2.3. Аналіз нуклеотидних послідовностей та філогенетичний аналіз.....	26
Висновок до розділу 2.....	30
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	32
3.1. Філогенетичний аналіз із застосуванням алгоритмів побудови дендрограм філогенетичних дерев.....	35
3.1.1. Результати аналізу генетичної подібності видів <i>Ascomycota</i> і <i>Basidiomycota</i> з використанням методу максимальної парсимонії.....	37
3.1.2. Результати аналізу генетичної подібності видів <i>Ascomycota</i> і <i>Basidiomycota</i> з використанням методу об'єднання найближчих сусідів.....	41
3.2. Аналіз нуклеотидних послідовностей 18S рРНК, 26S рРНК генів та ITS-послідовності.....	47
3.3. Порівняльний аналіз результатів за використання двох підходів ...	48
Висновок до розділу 3	49
ВИСНОВКИ	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	51

ВСТУП

Дані сучасної літератури представляють велику різноманітність дріжджів, задіяних як у традиційній біотехнології, так і у виробництві ферментів та метаболітів, біоремедиації, розробці фармацевтичних препаратів та про- та пребіотиків. За існуючими оцінками світове щорічне виробництво *Saccharomyces cerevisiae* становить більше ніж 1 мільйон тонн. Хоча *S.cerevisiae* залишається основним продуцентом для багатьох біотехнологічних процесів, зростає інтерес до застосування інших, так званих нетрадиційних дріжджів. Частково це можливо пояснити тим, що величезне біорізноманіття дріжджів являє собою велику еволюційну відстань та дає надію очікувати значні відмінності у білках і метаболічних шляхах між різними видами.

Вивчення фізіолого-біохімічних властивостей і біотехнологічного потенціалу дріжджів пов'язане з детальним аналізом геномів цих організмів, а саме з чіткою генетичною ідентифікацією представників та вивченням мінливості консервативних та варіабельних ділянок їх геномів [1]. З розвітком молекулярно-генетичних і біоінформатичних методів дослідження геномів мікроорганізмів стало можливим проводити їх ідентифікацію та вивчати мікроеволюційний процес шляхом порівняльного аналізу консервативних ділянок геному [2].

Актуальність даної роботи полягає у дослідженні нуклеотидних послідовностей генів 18S рРНК, 26S рРНК досліджуваних дріжджів для диференціації на роди і види. Молекулярний та геномний аналіз філогенетичного дерева грибів *Ascomycota* і *Basidiomycota* показав, що вони володіють найбільш похідними ознаками, що представляють собою вершину морфологічної складності серед грибів. Таким чином, біоінформатичні методи дослідження геномів мікроорганізмів дозволяють проводити їх ідентифікацію та вивчати еволюційний процес

Мета дослідження – провести молекулярно-філогенетичний аналіз між видами *Ascomycota* і *Basidiomycota* та диференціювати досліджуваних дріжджів на роди і види.

Завдання дослідження:

1. Виконати молекулярно-філогенетичний аналіз між видами *Ascomycota* і *Basidiomycota* на основі нуклеотидних послідовностей генів 18S рРНК, 26S рРНК та ITS-послідовностей, задепонованих у базах даних GenBank і AFTOL.
2. Побудувати дендрограми методами максимальної парсимонії та об'єднання найближчих сусідів.
3. Провести диференціація досліджуваних дріжджів на роди і види відбувається за використання ITS-послідовностей.

Об'єкт дослідження – генетична ідентифікація представників видів *Ascomycota* і *Basidiomycota*.

Предмет дослідження – молекулярно-філогенетичний аналіз між видами *Ascomycota* і *Basidiomycota*.

Методи дослідження – біоінформаційні, статистичні.

Наукова новизна.

У роботі узагальнено результати молекулярно-філогенетичного аналізу нуклеотидних послідовностей генів 18S рРНК, 26S рРНК та ITS-послідовностей між видами *Ascomycota* і *Basidiomycota* задепонованих у базах даних GenBank і AFTOL.

Практичне значення.

Запропоновано процедуру диференціації досліджуваних дріжджів на роди і види за використання ITS-послідовностей та при об'єднанні всіх трьох послідовностей (18S рРНК, 26S рРНК, ITS). Побудовано дендрограми методами максимальної парсимонії та об'єднання найближчих сусідів.

Апробація. Основні результати роботи представлено на конференціях:

1. XV Міжнародна науково-практична конференція «Новітні досягнення біотехнології». 22 – 23 вересня 2021 року. Київ, Україна.

Публікації:

1. Yarmolenko M.V., Zelena L.B., Hretsky I.O., Tkachuk N.V. Analysis of yeast conservative nucleotide sequences by genomic bioinformatic methods.V Міжнародна науково-практична конференція «Новітні досягнення біотехнології». 22 – 23 вересня 2021 року. Київ, Україна. [27].

Структура і обсяг. Дипломна магістерська робота складається зі вступу, трьох розділів, 13 рисунків, 6 таблиць, трьох висновків, списку з 34 використаних джерел, додатків. Обсяг дипломної магістерської роботи 59 сторінок.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Філогенетичний аналіз дріжджів

У 1996 році був опублікований геном *Saccharomyces cerevisiae*, який ознаменував початок нової ери в біології грибів [3]. Відтоді швидкий розвиток технологій секвенування та обчислювальної біології призвів до секвенування геномів для понад 800 видів (наприклад, <http://genome.jgi.doe.gov/fungi/>).

Ці геноми являють собою дані, які дають змогу проводити еволюційні дослідження грибів і пошук біологічних рішень для розробки альтернативного палива, біоремедиації, біосеквестрації углецю та сталого розвитку сільського та лісового господарства [4]. Геномні дані забезпечують максимальну кількість дискретної генетичної інформації, доступної для філогенетичного аналізу, а сотні й тисячі генів були ідентифіковані як корисні філогенетичні маркери [5]. Алгоритми кластеризації Маркова виявилися потужними інструментами для ідентифікації ортологічних кластерів білків, які можна відфільтрувати для отримання однокопійних кластерів, які корисні для філогенетичного аналізу [6]. Цей підхід змінив філогенетику, оскільки більше не вимагає вибору апріорного набору маркерів (наприклад, рДНК, RPB2 тощо), а скоріше сприяє видобутку набору даних геномів для найбільшого набору відповідних маркерів. Крім того, приховані моделі Маркова виявилися цінними інструментами для ідентифікації та отримання цих маркерів у нещодавно секвенованих геномах і швидко зростаючих наборах філогенетичних даних у масштабі геному [7].

Однак оцінка дерев видів на основі наборів даних у масштабі геному не позбавлена проблем. Філогенетичний аналіз геномних даних показав, що різні гени в геномі можуть мати різну еволюційну історію, тобто філогенетичний конфлікт [8]. Джерела конфлікту включають неповне сортування по лінії (або глибоке злиття), гібридизацію та горизонтальний перенесення генів, а виявлення та характеристика цього конфлікту в

контексті філогенетичного висновку все ще знаходяться в зародковому стані [9].

Незважаючи на згадані вище проблеми, філогенетичний аналіз наборів даних у масштабі геному та більш традиційних наборів даних із мультигенами значно покращив наше розуміння еволюції грибів. Історично гриби поділялися на чотири групи — хітридіоміцети, зигоміцети, аскоміцети та базидіоміцети — визначені за морфологічними ознаками, пов'язаними з розмноженням. Хітридіоміцети, або зооспорові гриби, були визнані на основі виробництва зооспор, що характеризуються одним заднім гладким джгутиком. Зигоміцети характеризувались гаметангіальною кон'югацією та утворенням зигоспор, ценоцитарних гіф і типово безстатевим розмноженням за допомогою спорангіїв. Аскоміцети та базидіоміцети були ідентифіковані за продукцією асків і базидії, відповідно, володіють регулярними перегородками гіфами та дикаріотичною ядерною фазою в їхньому життєвому циклі. Застосована класифікація царства грибів визнає вісім типів.

Молекулярний та геномний аналіз грибного дерева життя (рис. 1.1) показав, що численні морфології, на які наголошується в премолекулярній класифікації (наприклад, зооспори, зигоспори, морфологія плодового тіла тощо) не є діагностичними для монофілетичних груп. Швидше, таксони, які володіють цими ознаками, були більш складними моделі диверсифікації і часто є парафілетичними. Перші три лінії царства *Fungi*, включають переважно зооспорові гриби: *Cryptomycota*, *Blastocladiomycota* та *Chytridiomycota*. Гриби *Zygomycete* включають два окремих типи неджгутикових грибів: *Zoopagomycota* і *Mucoromycota*. Вони демонструють відмінності в асоціаціях господарів і субстратів — *Zoopagomycota* з тваринами і грибами, *Mucoromycota* з рослинами і рослинними субстратами — і можуть представляти морфологію та спосіб життя перших наземних грибів. *Ascomycota* і *Basidiomycota* володіють найбільш похідними ознаками, що представляють собою вершину морфологічної складності серед грибів.

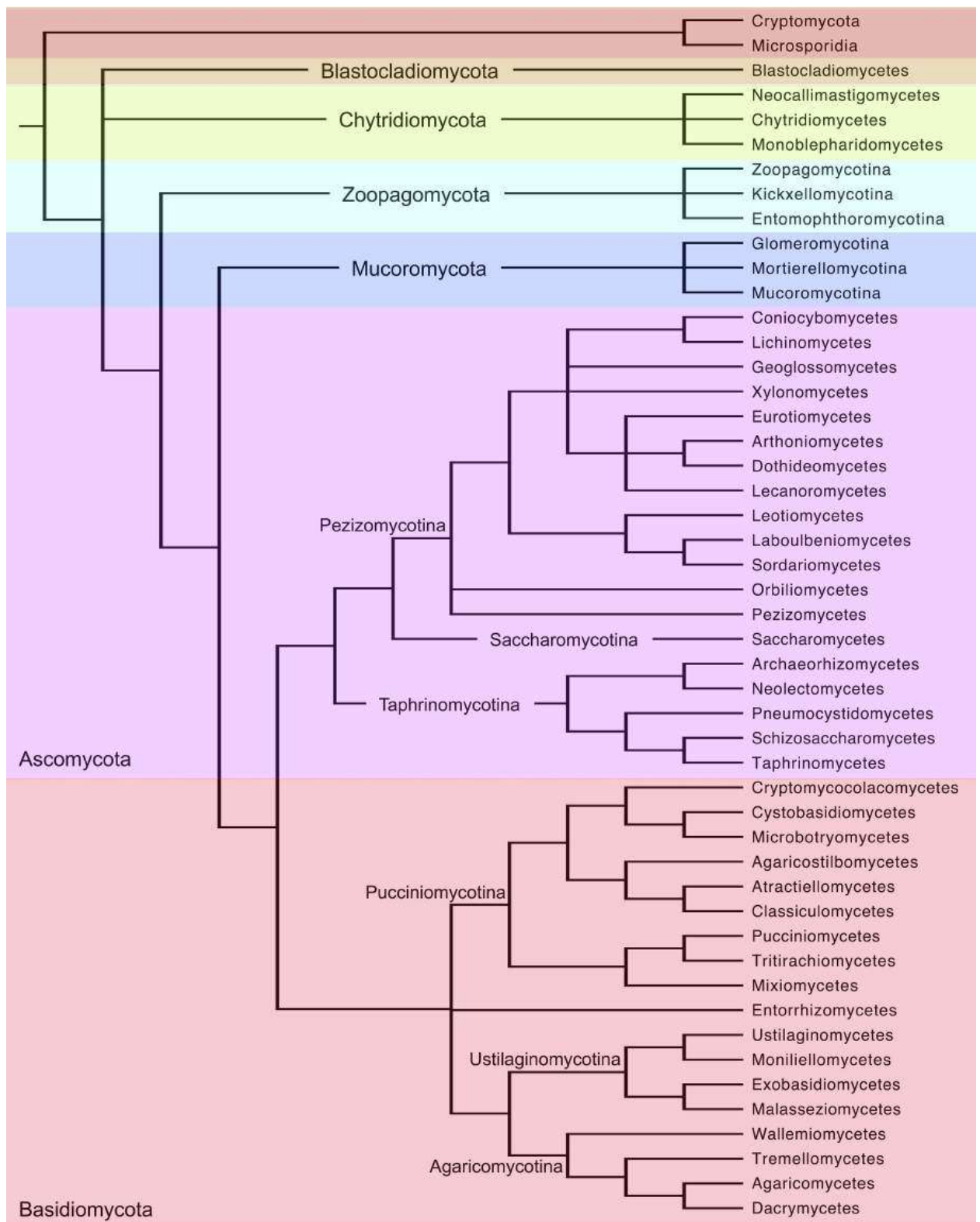


Рис. 1.1. Кладограма царства *Fungi* на основі опублікованих багатогенних і геномних філогеній .

1.1.1 Філогенетичне розміщення аскоміцетних дріжджів

Раніше у дослідженнях використовували послідовності 5S рРНК [10] для вивчення взаємозв'язків між грибами, і це порівняння розділило Ascomycota на три групи: (1) *Schizosaccharomyces* і *Protomyces* (*Taphrinomycotina*), (2) брунькувальні дріжджі (*Saccharomycotina*) і (3) «ниткоподібні гриби» (*Pezizomycotina*). Аналіз також показав, що дріжджі та «ниткоподібні гриби» є сестринськими таксонами і що *Schizosaccharomyces* та родичі представляють ранню розбіжну лінію.

На рис. 1.2 показано філогенетичні взаємозв'язки між родами *Saccharomycotina*, визначені на основі аналізу послідовності п'яти генів типових видів з найбільш прийнятних родів [11]. У цьому аналізі представники *Lipomycetaceae* (рис. 1.2, клад 11) є найбільш ранніми представниками *Saccharomycotina*, що розходяться. *Saccharomyces* та споріднені роди є одними з найбільш розбіжних представників *Saccharomycotina* (рис. 1.2, клад 1), і ця клада включає дріжджі, що ферментують цукор, які часто використовуються для виробництва етанолу. Фенотипові ознаки, які раніше використовувалися для висновку про спорідненість, такі як морфологія аскоспор і асиміляція нітратів, зустрічаються в багатьох кладах.

Підтримка багатьох ліній у сучасних філогенетичних деревах часто є слабкою, і більш надійний аналіз взаємовідносин між *Saccharomycotina* вимагає порівняння всього геному. На даний момент геномні послідовності доступні для менш ніж 100 дріжджів, і вони в основному з видів, що представляють генетичний, медичний або біотехнологічний інтерес. Аналіз цілих геномів, іноді на основі близько 400 ортологічних генів представили видові відносини, схожі на ті, що визначаються з набагато меншої кількості генів, але, навпаки, філогенетичні дерева, отримані в результаті цих аналізів, зазвичай мають набагато більшу підтримку гілок [12].

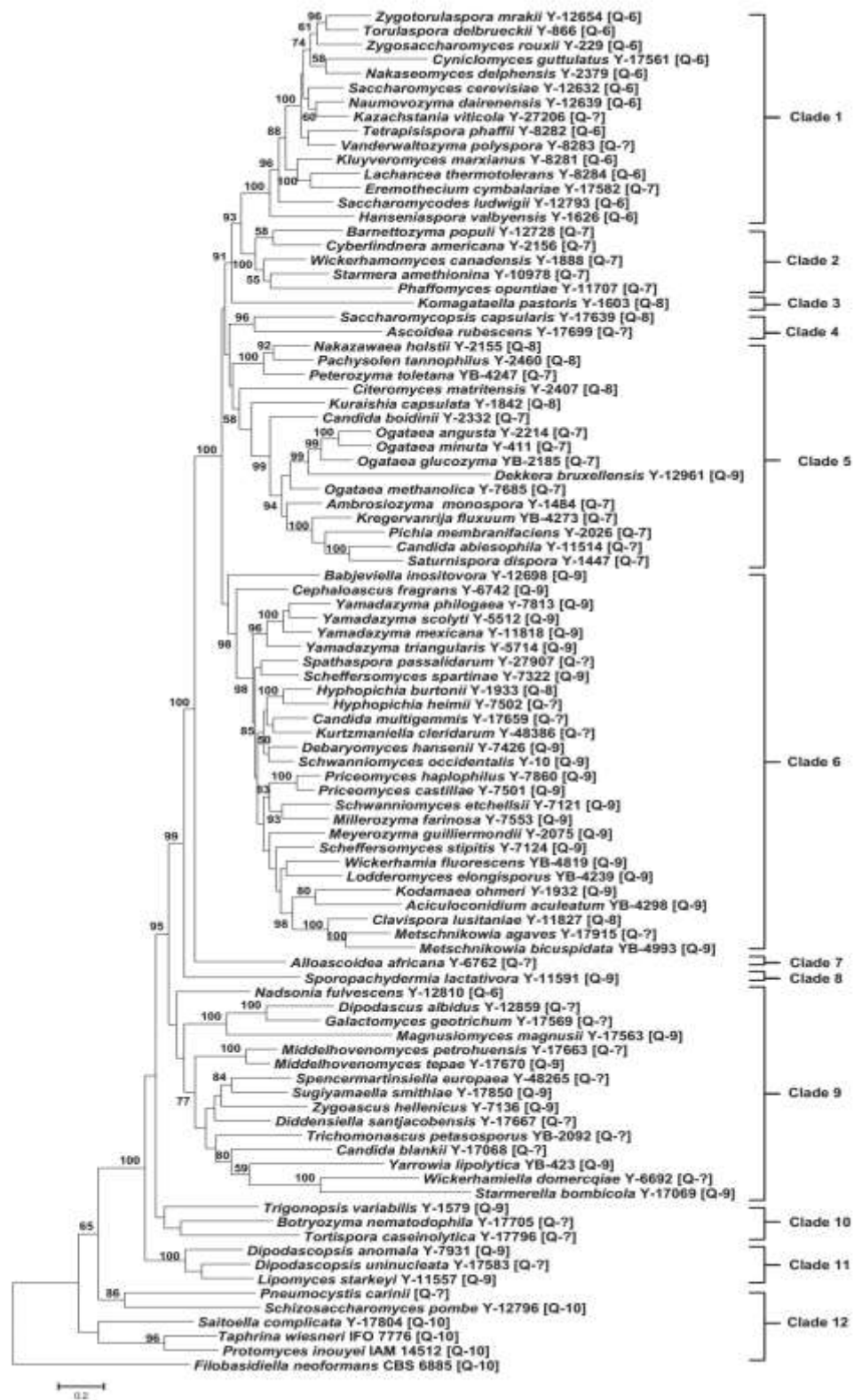


Рис. 1.2. Філогенетичні взаємозв'язки між типами родів дріжджів аскоміцетів та еталонних таксонів. Значення Bootstrap (1000 повторів) >50% наведено на вузлах гілок.

Як продемонстрували Rokas A. та ін. [13] з аналізу геномів видів *Saccharomyces*, було необхідно мінімум 20 об'єднаних генів, щоб забезпечити потужну підтримку розміщення видів в отриманих філогенетичних деревах. Оскільки *Saccharomyces* є невеликим рідом, вирішення взаємовідносин видів у більших родах потребує додаткових генів. Розміщення *Cyniclomyces*, *Eremothecium*, *Kazachstania*, *Kluuyveromyces*, *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovozyma*, *Saccharomyces*, *Tetrapisispora*, *Torulaspora*, *Vanderwaltozyma*, *Zygosaccharomyces* і *Zygotorulaspora* в сімействі *Saccharomyces* і *Zygotorulaspora*, як видається, представляють деякі інші сімейства *Saccharomyces*, які сильно підтримують (рис. 1.2, але інші клади можуть представляти кілька сімейств, наприклад, велика клада 6 (рис. 1.2), яка в даний час ідентифікована як *Debaryomycetaceae*).

1.1.2. Філогенетичне розміщення дріжджів-базидіоміцетів

Базидіоміцетові дріжджі є поліфілетичними і зустрічаються у всіх трьох підтипах *Basidiomycota*, а саме у *Pucciniomycotina*, *Agaricomycotina* та *Ustilaginomycotina* [14] (рис. 1.3). Усередині *Pucciniomycotina*, біологічно дуже різноманітної групи, яка в основному об'єднана даними молекулярної філогенезу, визнано дев'ять класів, але лише чотири мають види з дріжджовим станом. Цистобазидіоміцети включають переважно рожеві безстатеві дріжджі, які класифікуються в родах *Bannoa*, *Cyrenella*, частина видів *Rhodotorula*, частина видів *Sporobolomyces* і *Erythrobasidium*, а також різноманітна група статевих і диморфних видів, що класифікуються в родах *Cystobasidium*, *Naoghidea* і *Saoghidea*. *Cystobasidiomycetes* мають три порядки: (1) *Cystobasidiales* з *Cystobasidium* і *Occultifur*, а також деякі види *Rhodotorula*, включаючи *Rhodotorula minuta* і *Rh.slooffiae*; (2) *Erythrobasidiales* з *Erythrobasidium* і *Bannoa*, *Rh. lactosa* і деякі види *Sporobolomyces*, такі як *Sporobolomyces ogasawarensis* і (3) *Naohideales* з роду *Naohidea*, який утворює колонії кремового кольору в культурі. Мікроботріоміцети включають багато видів так званих червоних дріжджів,

що належать до *Rhodotorula* і *Rhodospodium*. Таксони дріжджів переважно належать до двох порядків, *Leucosporidiales* і *Sporidiobolales*. Перший підтримує два статевих і теліоспороутворюючі роди, тобто більшість видів *Leucosporidium* і *Mastigobasidium*, а також їх нестатеві аналоги. *Sporidiobolales* включають рожеве забарвлення видів у статевих і теліоспороутворюючих родах *Rhodospodium* і *Sporidiobolus* та їх нестатевих еквівалентах, *Rhodotorula* і *Sporobolomyces*, відповідно. Класифікація цих грибів, особливо анаморфного роду *Rhodotorula*, потребує перегляду, і ми очікуємо, що в найближчому майбутньому цьому сприятиме багатогенні та цілі геномні філогенії.

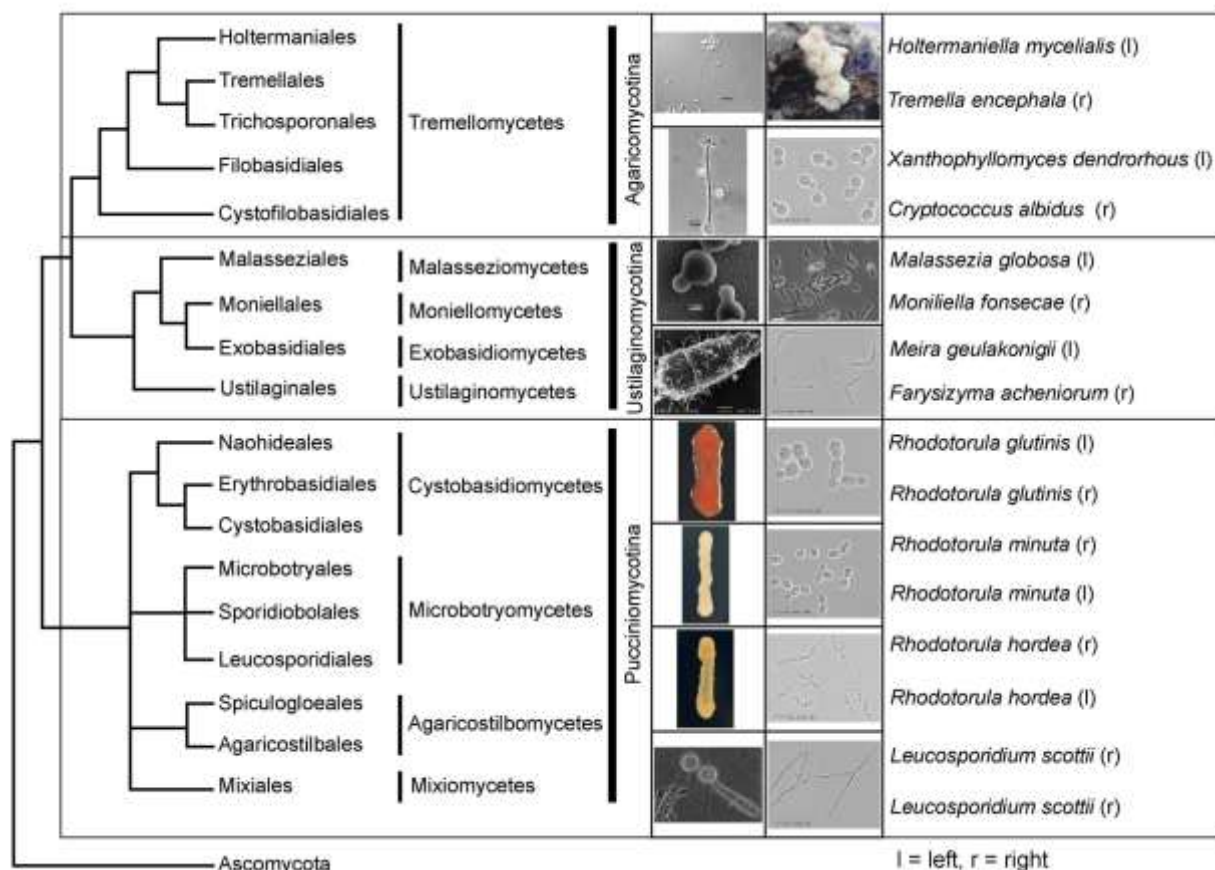


Рис. 1.3. Схематичне зображення трьох підтипів базидіоміцетових дріжджів. Веб-сайт CBS (<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/Biolomics.aspx?Table=CBS%20strain%20database>).

Кілька клад здаються добре визначеними і можуть представляти окремі роди, наприклад кладу *aerius*, кладу *albidus*, *gastricus* клади та циліндричної клади [15]. Квіткообразна клада включає види *Filobasidium* разом з деякими криптококами, тобто *C.magnus*, *C.oeirensis*, *C.chernovii*, *C.stepposus* і *C.wieringae*. Таксономічний зв'язок *F.uniguttulatum* з іншими видами *Filobasidium* потребує подальшого дослідження.

Найбільший загін серед тремелломіцетів — це *Tremellales*, який містить багато таксонів, що утворюють гриби, які є мікопаразитарними та диморфними. Молекулярно-філогенетичні дані переконливо підтверджують включення анаморфних таксонів [16-18].

Порядок *Ustilaginales* містить ряд анаморфних видів, які в даний час віднесені до поліфілетичного роду *Pseudozyma*. Види *Farysizyma* і *Pseudozyma* можуть являти собою анаморфи деяких телеоморфних збудників рослин. На основі мультигенного аналізу, *Pseudozyma prolifica*, типовий вид роду, здається ідентичним *Ustilago maydis* [19], а *Farysizyma acheniorum* може представляти *Farisia thuemarii* [20]. Серед екзобазидіоміцетів види з дріжджовим або дріжджоподібним станом зустрічаються в *Entylomatales*, *Microstromatales*, *Georgefischeriiales*, *Malasseziales* та *Exobasidiales* [19]. Рід *Tilletiopsis* є поліфілетичним.

Ідентифікація та класифікація дріжджів та інших грибів зараз майже виключно здійснюється за допомогою аналізу послідовності ДНК, що призвело до відкриття багатьох нових видів, а також до змін у віднесенні видів до роду. Порівняння послідовностей показало, що статеві та безстатеві види часто є членами одного роду, але попередні видання Міжнародного кодексу ботанічної номенклатури вимагали, щоб статеві (телеоморфні) та безстатеві (анаморфні) види були віднесені до різних родів.

1.2. Видова ідентифікація дріжджів

Швидку ідентифікацію окремих видів дріжджів зараз визначають за розбіжністю нуклеотидної послідовності в доменах 1 і 2 (D1/D2) гена рРНК

великої субодиниці (LSU). На практиці це робиться шляхом проведення пошуку ново визначеної послідовності з депонованими послідовностями, які обслуговуються GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) та з пов'язаними базами даних. Ділянка D1/D2 приблизно з 450–600 нуклеотидів обмежена висококонсервативними послідовностями, і по суті всі види можуть бути ампліфіковані ПЛР за допомогою одного набору праймерів [21]. Важливість єдиної системи діагностики генів полягає в тому, що в міру відкриття нових видів база даних, що постійно розширюється, забезпечує документацію всіх описаних видів, а також докази неописаних видів через відсутність їх послідовностей. Другою базою даних, яка широко використовується, є внутрішній транскрибований спейсер (ITS), який розташований між генами рРНК SSU та LSU. Послідовність ITS розділена на дві секції (ITS1, ITS2) за допомогою гена 5.8S, який є висококонсервативним і його не слід включати при порівнянні замін у ITS. Послідовності D1/D2 і ITS часто подібні за довжиною, але повідомлялося про помітні відмінності в довжині для деяких аскоміцетів [22] і деяких базидіоміцетів [23], що призводить до різної довжина нуклеотидів для визначення відсотка замін. За допомогою відповідних ПЛР-праймерів ITS і D1/D2 можна реплікувати як один амплікон. При проведенні порівняння слід проводити з послідовністю типового штаму виду, який дає найближчу відповідність, оскільки депозити в базі даних містять багато штамів із помилковими назвами.

Розділення видів як для аскоміцетів, так і для базидіоміцетів базується на передбаченні, що штами виду розходяться в послідовностях D1/D2 і ITS не більше ніж на 1% [24]. Для ITS розбіжність послідовностей між близькоспорідненими видами може бути відносно невеликою в кладах *Saccharomycetaceae* [22], або досить великою, як це видно для *Citeromyces* [25]. Не дивно, що були знайдені винятки для передбачення 1% або більше нуклеотидної дивергенції між видами для послідовностей D1/D2 і ITS, і це може бути результатом міжвидової гібридизації, різних швидкостей заміщення або інших генетичних змін. У перспективі бази даних D1/D2 і ITS

представляють собою потужний інструмент для швидкої ідентифікації видів і для імовірного виявлення раніше невідомих родоци. Використання послідовностей ДНК для ідентифікації більш ніж вдвічі збільшило кількість відомих видів дріжджів протягом останнього десятиліття [26]. Слід зазначити, що ITS був обраний як універсальна послідовність ДНК для ідентифікації грибів, оскільки D1/D2 був менш розрізняючим для деяких недріжджових грибкових ліній [27].

Для деяких застосувань секвенування ДНК може не знадобитися. Молекулярні методи, засновані на послідовностях відомих видів, доступні в GenBank та інших базах даних і можуть бути використані для розробки видоспецифічних пар праймерів і зондів. Інші застосування включають випадково ампліфіковану поліморфну ДНК (RAPD), поліморфізм довжини ампліфікованого фрагмента (AFLP) і поліморфізм довжини рестрикційного фрагмента (RFLP).

Видоспецифічні праймери

Використання видоспецифічних пар праймерів ефективно, коли використовується для ідентифікації на основі ПЛР, що включає невелику кількість відомих видів, або коли певний вид є предметом пошуку (Fell 1993; Mannarelli and Kurtzman 1998; Chapman et al. 2003); Хулін і Вілс 2014). Після реакції ПЛР суміш поділяють за допомогою гель-електрофорезу для візуального виявлення смуги, яка ідентифікує цільовий вид.

PNA

Зонди пептидної нуклеїнової кислоти (PNA) пропонують засіб для виявлення та кількісної оцінки видів у клінічних зразках, харчових продуктах та інших субстратах за допомогою флуоресцентної гібридизації *in situ*. Зонди PNA мають пептидний скелет, до якого приєднані нуклеотиди, комплементарні видоспецифічній цільовій послідовності, і додається флуоресцентна мітка для виявлення за допомогою флуоресцентної мікроскопії (Stender et al. 2001; Rigby et al. 2002). Якщо зонди є

комплементарними до рРНК, вся клітина цільового виду буде «світитися» під час візуалізації, що також дозволить кількісно визначити кількість клітин.

RAPD/AFLP

RAPD ефективно використовувалися для швидкої попередньої ідентифікації великої кількості базованих ізолятів, а також потім часто слідує секвенування генів репрезентативних штамів з кожної групи, яка має унікальний малюнок. Однією з проблем у використанні методів ідентифікації на основі шаблонів є відтворюваність між лабораторіями, оскільки вони невеликі відмінності в умовах ПЛР можуть вплинути на типові моделі, які слугують еталонними.

ПЛР в режимі реального часу

Методика ПЛР у реальному часі також широко вивчалася для застосування в медичній мікології, особливо для виявлення та кількісної оцінки кількості *Candida albicans*. Зазвичай використовувані праймери були засновані на послідовностях повтору рДНК, таких як ITS 1 і 2, або гені рРНК малої субодиниці (SSU) (Loeffler et al. 2000; Klingspor and Jalal 2006; Bergman et al. 2007; Khlif et al. 2009; Веллінг-hausen та ін. 2009). Цей метод також набуває широкого застосування в аналізі харчових продуктів і напоїв і використовується для виявлення та кількісної оцінки псування дріжджів в апельсиновому соку (Casey and Dobson 2004), а також при ферментації вина (Cocolin, Heisey and Mills 2001).

DGGE

Денатуруючий градієнтний гель-електрофорез (DGGE) – це метод, який використовувався для ідентифікації видів та кількісної оцінки популяцій дріжджів у продуктах харчування та напоях. Методика заснована на розділенні фрагментів ДНК, які відрізняються нуклеотидними послідовностями (наприклад, видоспецифічними) через знижену електрофоретичну рухливість частково розплавлених дволанцюгових ДНК-ампліконів у поліакриламідному гелі, що містить лінійний градієнт денатурантів ДНК (тобто суміш сечовини та формаміду).). Спорідненою

технікою є гель-електрофорез з градієнтом температури, при якому градієнт гелю DGGE замінюється градієнтом температури (Muzyer and Smalla 1998). Застосування DGGE включали ідентифікацію та динаміку популяції дріжджів, напр. хліб на заквасці (Meroth, Hammes and Hertel 2003), у ферментації кави (Masoud et al. 2004) і на винному винограді (Prakitchaiwattana, Fleet and Heard 2004). Рівні виявлення часто становлять близько 10^3 КУО/мл але повідомлялося про 10^2 КУО/мл, що вигідно порівняно зі стандартними методами підрахунку планшетів (Prakitchaiwattana, Fleet and Heard 2004).

Проточна цитометрія

Високопродуктивні методи гібридизації зондів доступні для виявлення кількох видів у кількох зразках. Одним із методів, ефективних для дріжджів (Diaz and Fell 2004; Page і Kurtzman 2005), є адаптація технології Luminex xMAP (Luminex Corp), яка складається з комбінації 100 різних наборів флуоресцентних кульок, ковалентно зв'язаних з видоспецифічною ДНК. зонди захоплення. Після гібридизації кульки, що несуть цільові амплікони, класифікуються на проточному цитометрі за їх спектральними адресами за допомогою лазера 635 нм. Гібридизований біотинілований амплікон визначається кількісно за допомогою флуоресцентного детектування за допомогою лазера 532 нм. Штами, які відрізняються на один нуклеотид, часто можна розрізнити, і аналіз можна виконати після ампліфікації менш ніж за 50 хвилин у форматі з 96 лунками з до 100 різними видоспецифічними зондами на лунку.

Щойно описані методи молекулярного виявлення надали деякі чудові можливості для ідентифікації дріжджів, але низка факторів впливає на виявлення та кількісне визначення. Вони включають (1) кількість клітинних копій гена, який буде використаний, (2) чи достатньо ген консервований для ампліфікації ПЛР за допомогою «універсальних» праймерів, які виявлять усі цікаві види, (3) ефективність вилучення ДНК з клітин у зразку, (4) ефективність відновлення ДНК із зразка, (5) компоненти зразка, які можуть

перешкоджати відновленню ДНК або ампліфікації ПЛР та (б) рівень популяції клітин, який можна виявити.

Раніше ідентифікація дріжджів була заснована на порівняльній фізіології, в якій визначали здатність ферментувати певні моно-, ди- і трисахариди, а також характер використання цукрів, органічних кислот, спиртів, цукрових спиртів, крохмалю та деяких сполук азоту. Методи молекулярної ідентифікації починалися з визначення співвідношення гуанін + цитозин (G + C) (наприклад, Nakase і Komagata 1968), а незабаром послідували методики реасоціації ядерної ДНК (наприклад, Price, Fuson and Phaff 1978). Однак впровадження технології секвенування рДНК сприяло недавньому різкому збільшенню кількості описаних видів дріжджів (Kurtzman and Robnett 1998; Fell et al. 2000). З аналізу видів, описаних протягом останніх двох століть, можна побачити, що виявлення видів дріжджів швидко зросло на початку 20 століття з використанням фізіологічних профілів росту, що призвело до опису 460 видів дріжджів. 1930-ті роки. За цим послідувало зниження в 1940–1950-х роках через Другу світову війну та її економічні наслідки. Зниження, яке спостерігалось в 1990-х роках, може бути пов'язано з усвідомленням обмеженості використання фізіологічних моделей росту в розрізненнях видів, і, отже, з'явилося небажання використовувати такі дані для розрізнення нових видів. Однак із запровадженням баз даних D1/D2 та ITS як для аскоміцетних, так і для азідіоміцетних дріжджів (Kurtzman and Robnett 1998; Fell et al. 2000; Scorzetti et al. 2002; та багатьох публікацій, які послідували), опис нових видів швидко збільшувався. Основним результатом цих досліджень штрихового кодування було те, що в першому десятилітті 21 століття було описано понад 900 видів, і очевидно, що ця тенденція збережеться і в майбутньому, з огляду на те, що значна частина біомів Землі ще не була відібрана для дріжджі. У п'ятому виданні *The Yeasts, a Taxonomic Study* (Kurtzman, Fell and Boekhout 2011) було прийнято >1400 видів дріжджів, які належать до 85 родів аскоміцетів і

61 родів базидіоміцетів, але з моменту публікації цієї обробки було зареєстровано >230 видів дріжджів у Mycobank <http://www.mycobank.org/>).

Мас-спектрометрія MALDI-TOF.

Ідентифікація на основі MALDI-TOF MS зробила революцію в ідентифікації мікробів, включаючи дріжджі, у багатьох лабораторіях по всьому світу. У порівнянні з методами ідентифікації на основі ДНК, такими як аналіз послідовності доменів D1/D2 рДНК LSU та ITS 1 і 2 областей рДНК, MALDI-TOF MS дає ідентифікацію за короткий час (Tan et al. 2012). ; Cassagne et al. 2013). MALDI-TOF MS успішно застосовувався для ідентифікації ізолятів багатьох клінічно значущих дріжджів, напр. *guytococcus neoformans*/C. комплекс видів *gattii*, *Ca. albicans* і non albicans види *Candida*, артроконідіальні дріжджі *Geotrichum* і *Trichosporon* spp. і *Malassezia* spp. (Marklein et al. 2009; McTaggart et al. 2011; Hagen et al. 2015). Зі збільшенням охоплення видів дріжджів у базах даних, корисність методики буде ще більше зростати.

Висновок до розділу 1: Молекулярний та геномний аналіз філогенетичного дерева грибів показав, що численні морфології, на які наголошується в премолекулярній класифікації (наприклад, зооспори, зигоспори, морфологія плодового тіла тощо) не є діагностичними для монофілетичних груп. Таксони, які володіють цими ознаками, були більш складними і часто парафілетичними. Гриби *Zygomycete* включають два окремих типи неджгутикових грибів: *Zoopagomycota* і *Mucoromycota*. *Ascomycota* і *Basidiomycota* володіють найбільш похідними ознаками, що представляють собою вершину морфологічної складності серед грибів.

Філогенетичний аналіз за своєю природою упереджений через «невидимий вимір різноманітності грибів». Вибір екологічних зразків екосистем і ніш узгоджується з існуванням численних невідомих ліній вищого рівня. Наразі включення невідомих грибів у філогенетичний аналіз

обмежено кількома локусами обмеженої філогенетичної інформативності, які можна отримати за допомогою підходів відбору проб на основі ампліконів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Характеристика об'єкту дослідження

Як об'єкт дослідження використовували дріжджі, що відносяться до типів *Ascomycota* і *Basidiomycota*, а саме штами дріжджів видів: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. sp. boulardii*, *S.uvarum*, *Kluuveromyces marxianus*, *K.lactis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *R.hordea*, *R.glutinis*.

2.2. Бази даних нуклеотидних послідовностей.

Для виконання поставлених задач здійснювали пошук нуклеотидних послідовностей консервативних ділянок геномів представників родів *Kluuveromyces*, *Saccharomyces* та *Rhodotorula* в електронних базах даних:

- **GenBank** (опції – **BioProject PRJNA177353, Nucleotide**): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (рис. 2.1А);
- **AFTOL (Assembling the Fungal Tree of Life)**: <https://aftol.umn.edu> (рис. 2.1Б).

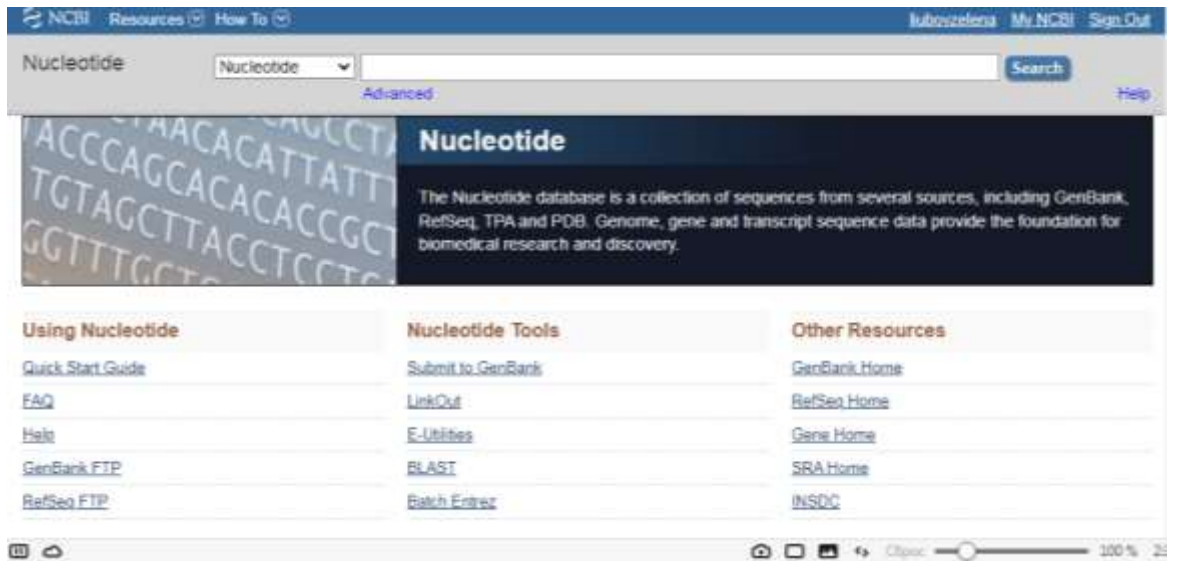
Пошук проводили з використанням відповідних опцій та ключових слів, які містили назву виду / роду та назву консервативної ділянки.

Як консервативні ділянки геному розглядали: гени рРНК малої та великої субодиниць рибосом (18S рРНК та 26S рРНК), а також ITS-послідовність (внутрішній транскрибуємий спейсер).

Кількість відібраних для аналізу нуклеотидних послідовностей консервативних ділянок геномів для кожного виду наведена у таблиці 2.1.

2.3. Аналіз нуклеотидних послідовностей та філогенетичний аналіз.

Конкатенацію сиквенсів здійснювали за допомогою програми FaBox (1.6), яка знаходиться у вільному доступі в інтернеті: <https://birc.au.dk/~palle/php/fabox/> (рис 2.2).



А



Б

Рис. 2.1. Інтерфейс баз даних нуклеотидних послідовностей.

А – GenBank; Б – AFTOL.

Об'єднували сиквенс генів 18S рРНК, 26S рРНК та ITS-послідовності, що належали до одного штаму.

Обробку нуклеотидних послідовностей, вирівнювання, аналіз константних, варіабельних, парсимоній-інформативних та синглетонних сайтів проводили з використанням пакету програм MEGA 7 [28].

Мікроорганізми та нуклеотидні послідовності, використані у роботі

Вид	Кількість нуклеотидних послідовностей		
	18S рРНК	26S рРНК	ITS
<i>S.cerevisiae</i>	5	9	10
<i>S. sp. boulardii</i>	-	-	3
<i>K. lactis</i>	4	7	8
<i>K.marxianus</i>	5	9	6
<i>R.mucilaginosa</i>	4	11	12
<i>R.hordea</i>	2	7	7
<i>R.glutinis</i>	5	7	5

Welcome to FaBox (1.6) - an online fasta sequence toolbox

[\[FAQ\]](#) 



16.11.2021 Version 1.6 - updated to PHP 8.0
 21.03.2019 Version 1.5 - Haplotypcollapser working again.
 21.03.2019 I hate my users - now I was forced to code php again..
 19.02.2019 Please stop using fabox - it is outdated!
 19.02.2019 Moved to new server - a few code changes to still work.
 18.02.2013 Added fasta sequence subtractor
 06.08.2012 Small bug in random sequence generator fixed
 29.08.2011 Update with newick parser
 10.09.2009 FaBox has moved to http://www.birc.au.dk/software/fabox
 16.01.2009 Added the fasta2PAWL converter

Sequence 2 fasta converters (external tools)
[HCV Sequence Conversion Interface - ReadSeq at EBI](#)

Working with fasta headers
[Fasta header extractor \(and header splitter\)](#) Simple and fast way of extraction the headers from fasta files - and optionally split each header into fields based on a chosen character/word.

Рис.2.2. Інтерфейс програми FaBox (1.6)

Множинне вирівнювання нуклеотидних послідовностей здійснювали за допомогою алгоритму ClustalW. Неоднозначно вирівняні ділянки були виключені з філогенетичного аналізу.

Біологічне значення множинного вирівнювання має еволюційне направлення: воно відображає походження нуклеотидних послідовностей від єдиної предкової послідовності. Якщо ж послідовності не мають спільного походження, то вирівнювання не буде. При вирівнюванні можна виявити консервативні та варіабельні ділянки або й сайти. Консервативність певних ділянок нуклеотидних послідовностей може свідчити про їх функціональну значимість: наприклад, вони можуть бути функціональними доменами білкової структури або ж сайтами зв'язування лігандів.

Вирівняні нуклеотидні послідовності аналізували за наступними показниками:

1. кількість консервативних сайтів. Консервативний сайт містить один і той же нуклеотид в усіх послідовностях, що порівнюються;

2. кількість варіабельних сайтів. Варіабельний сайт містить щонайменше два типи нуклеотидів. Серед варіабельних сайтів розрізняють парсимоній-інформативні та синглетонні сайти;

3. кількість парсимоній-інформативних сайтів. Тобто такий сайт має містити принаймні два типи нуклеотидів, і принаймні два з них повинні зустрічатися з мінімальною частотою 2;

4. кількість синглетонних сайтів. Синглетонний сайт містить принаймні два типи нуклеотидів, причому щонайбільше один зустрічається кілька разів. Програма MEGA ідентифікує сайт як синглетонний, якщо принаймні три послідовності містять однозначні нуклеотиди.

Філогенетичний аналіз проводили з використанням пакету програм MEGA 7. Здійснювали розрахунок:

5. генетичних відстаней між таксономічними групами. Величина генетичної відстані розраховується як частка нуклеотидних відмінностей між кожною парою послідовностей.

6. середнє значення внутрішньородової мінливості.

На основі сиквенсів консервативних ділянок геному, як окремих генів, так і конкатенованих послідовностей, конструювали дендрограми. Для цього залучали два методи:

- **метод максимальної парсимонії.** Максимальна парсимонія передбачає, що мінімальні зміни призводять до всього різноманіття послідовностей, які мають спільного предка. Тому цей метод називають ще методом мінімальної еволюції. Саме для того, щоб передбачити, які саме сайти або локуси є найбільш вірогідними місцями дивергенції послідовностей, необхідно множинне вирівнювання. Для побудови дендрограми за допомогою цього методу залучаються лише сайти, в яких локалізовані принаймні два різних типи нуклеотидів, кожен з яких представлений принаймні двічі, тобто парсимоній-інформативні сайти. Метод максимальної парсимонії використовують для аналізу послідовностей з високим рівнем схожості;
- **метод об'єднання найближчих сусідів.** Цей метод є методом побудови еволюційних дерев на основі величин генетичних відстаней. Метод об'єднання найближчих сусідів став основою реконструкції філогенезу і, ймовірно, є найбільш широко використовуваним алгоритмом на основі генетичних відстаней. Метод застосовують для невеликих вибірок, а результати досліджень показують, що він є достатньо точним, принаймні для випадків, коли припускають, що швидкість еволюційних процесів не є надзвичайно високою або низькою.

А також в обох методах використовували 2-параметричну модель Кімури. 2-параметрична модель Кімури мала наступні опції: враховувались транзиції та трансверсії, темпи змін у сайтах – рівномірні. Показник бутстреп аналізу розраховувався за 1000 репліками.

Висновки до розділу 2:

Як консервативні ділянки геному розглядали: гени рРНК малої та великої субодиниць рибосом (18S рРНК та 26S рРНК), а також ITS-послідовність (внутрішній транскрибуємий спейсер).

Біологічне значення множинного вирівнювання має еволюційне направлення: воно відображає походження нуклеотидних послідовностей від єдиної предкової послідовності. Якщо ж послідовності не мають спільного походження, то вирівнювання не буде. При вирівнюванні можна виявити консервативні та варіабельні ділянки або й сайти. Консервативність певних ділянок нуклеотидних послідовностей може свідчити про їх функціональну значимість: наприклад, вони можуть бути функціональними доменами білкової структури або ж сайтами зв'язування лігандів.

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

З розвитком молекулярно-генетичних і біоінформатичних методів дослідження геномів мікроорганізмів стало можливим проводити їх ідентифікацію та вивчати мікроеволюційні процеси шляхом порівняльного аналізу консервативних ділянок геному.

Швидкі темпи розвитку молекулярно-біологічних методів і підходів дозволяють накопичувати і створювати великі за обсягом бази даних результатів досліджень цього напрямку. Тому дослідники стикаються з новою проблемою, пов'язаною з необхідністю обробляти та аналізувати значні масиви інформації. Зокрема це стосується баз даних, які містять нуклеотидні послідовності (GenBank, EMBL тощо).

Онлайн-сервіси дозволяють отримувати інформацію з таких баз даних у вигляді анотованого списку нуклеотидних послідовностей, отриманих у відповідь на запит. Запит, як правило, містить ключові слова, наприклад назву гену або організму, номер нуклеотидної послідовності, під яким вона була задепонована та ін. Отримані у результаті запиту дані мають дуже обмежені можливості щодо їх обробки та аналізу. У випадку, коли отриманий список містить декілька записів, у дослідників є можливість переглянути їх та проаналізувати. Однак, частіше, подібний список містить декілька сотень або й тисяч записів, що робить перегляд всіх записів доволі тривалим, а подібну роботу неефективною, нераціональною або й неможливою. Наприклад, дані пошуку у GenBank з опцією Nucleotide містять 1 459 069 записів, пов'язаних із родом *Saccharomyces* (рис. 3.1) .

Якщо питання полягає в тому, скільки нуклеотидних послідовностей існує для кожного виду роду *Saccharomyces* в наборі даних і до яких генів вони відносяться, то ручний перегляд повного списку, який містить необхідні дані, видається неможливим завданням.

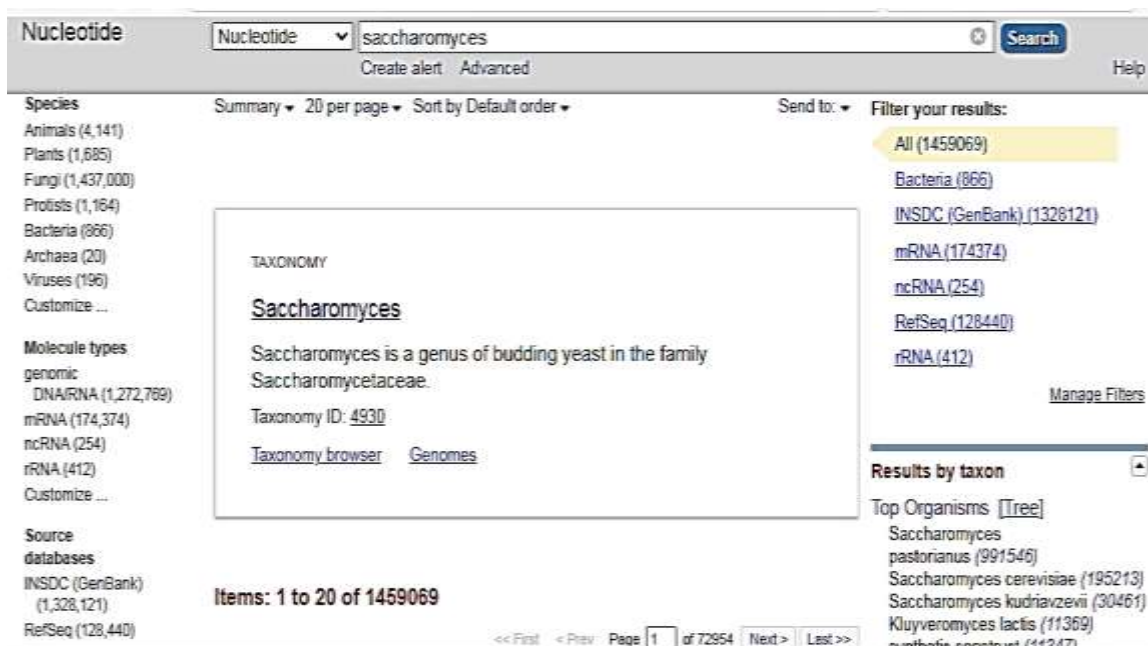


Рис. 3.1. Інтерфейс бази даних GenBank з пошуковим запитом *Saccharomyces* (опція Nucleotide)

Серія запитів із різними видами та генами не полегшує завдання. Крім того, бази даних містять помилки та неточності; тому при використанні прямих запитів частина даних може бути відсутня у запиті, що спричиняє спотворення кінцевих результатів.

Результати проведеного пошуку нуклеотидних послідовностей для кожного з досліджуваних у роботі видів показав, що найменше нуклеотидних послідовностей задепоновано у виду *R.hordea*, а найбільше - *S.cerevisiae* (табл. 3.1). Безумовно, така відмінність у кількості сиквенсів пов'язана з тим, що *S.cerevisiae* є найпростішим одноклітинним еукаріотичним організмом та широко використовується як об'єкт, модельний організм, у багатьох дослідженнях. Однак, слід відмітити, що кількість нуклеотидних послідовностей у базі даних зростає кожного дня, тому слід враховувати дату отримання результатів запити. Крім того, вид *R.hordea* було перекласифіковано у вид *Ustilentyloma graminis*, хоча це не позначилось на результати пошуку.

**Результати пошукового запиту у базі даних GenBank, опція
Nucleotide для досліджуваних видів *Ascomycota* і *Basidiomycota***

(дані на листопад 2021)

Вид	Загальна кількість записів
<i>S.cerevisiae</i>	195213
<i>S. sp. boulardii</i>	276
<i>K. lactis</i>	60217
<i>K.marxianus</i>	57508
<i>R.mucilaginosa</i>	3361
<i>R.hordea (Ustilentyloma graminis)</i>	81
<i>R.glutinis</i>	685

У роботі також було проведено пошук задепонованих послідовностей консервативних ділянок (18S рРНК, 26S рРНК та ITS-послідовність) у досліджуваних видів трьох родів: *Saccharomyces*, *Kluuveromyces* *Rhodotorula*. Результати представлені у таблиці 3.2. Як показано, для виду *S. sp. boulardii* не було знайдено сиквенсів генів 18S рРНК, 26S рРНК за заданими параметрами пошуку. Найбільш представлені у базі даних послідовності гену 26S рРНК із загальною кількістю 4664, найменш представлені сиквенси гену рРНК малої субодиниці рибосом, загальна кількість – 2025. Серед досліджуваних видів, за трьома консервативними ділянками, найбільш представленими виявились *S.cerevisiae* та *R.mucilaginosa*, для яких загальна кількість становила 5322 і 1567 сиквенсів. Найменш представленим був вид *S. sp. boulardii* зі 23 послідовностями, задепонованими у GenBank.

Кількість нуклеотидних послідовностей генів 18S рРНК, 26S рРНК та ITS-послідовностей у базі даних GenBank для досліджуваних

видів *Ascomycota* і *Basidiomycota*

(дані на листопад 2021)

Вид	Кількість нуклеотидних послідовностей		
	18S рРНК	26S рРНК	ITS
<i>S.cerevisiae</i>	866	2065	2391
<i>S. sp. boulardii</i>	-	-	23
<i>K. lactis</i>	410	587	470
<i>K.marxianus</i>	277	692	171
<i>R.mucilaginosa</i>	389	1058	120
<i>R.hordea</i>	11	50	16
<i>R.glutinis</i>	72	212	38

3.1. Філогенетичний аналіз із застосуванням алгоритмів побудови дендрограм філогенетичних дерев

На основі нуклеотидних послідовностей генів 18S рРНК, 26S рРНК та ITS-послідовностей у роботі проведено філогенетичний аналіз між видами *Ascomycota* і *Basidiomycota* з використанням задепонованих у базах даних сиквенсів. Для встановлення генетичної подібності та філогенетичних взаємозв'язків використано методи максимальної парсимонії та об'єднання найближчих сусідів та сконструйовано дендрограми

Філогенетичне дерево або дендрограма — це діаграма, яка зображує лінії еволюційного походження різних видів, організмів або генів від спільного предка [29]. Філогенія корисна для організації знань про біологічне різноманіття, для структурування класифікацій і для розуміння подій, що відбулися під час еволюції. Крім того, оскільки ці дерева походять від спільного предка, і оскільки більшість доказів еволюції свідчать про спільне

походження організмів, потрібно зрозуміти філогенію, щоб повністю оцінити докази, що підтримують монофілетичне походження видів.

Філогенетичні дерева – це діаграми еволюційних зв'язків між організмами. Аналіз послідовностей ДНК організмів допомагає оцінити ці взаємозв'язки. Оскільки організми еволюціонують і розходяться, їх ДНК накопичують мутації. Порівняння цих мутацій, використовуючи вирівнювання послідовностей та побудову дендрограм сприяє дослідженню еволюційних та мікроеволюційних подій, внаслідок чого відбулась дивергенція видів.

Філогенетичні дерева будують на основі даних нуклеотидних послідовностей ДНК чи РНК, або ж амінокислотних послідовностей білків. При цьому розглядають лише гомологічні послідовності, тобто послідовності, що походять від однієї предкової форми та переважно кодують той самий білок або РНК. У представленій роботі такими послідовностями є гени рРНК великої і малої субодиниць рибосом, а також послідовність, розташована між генами рРНК.

Для побудови філогенетичних дерев застосовують різні методи. Основними підходами для конструювання дендрограм є [30]:

- методи з використанням значень генетичних відстаней або методи кластеризації. Вони спираються на розрахунок величин генетичної відстані між видами. Ці величини відповідають кількості відмінностей між двома послідовностями. До таких методів відносяться, наприклад, методи на основі групування, такі як UPGMA (метод незваженої парної групи та середнє арифметичне) та метод об'єднання найближчих сусідів, вперше запропонований у 1987 році Неєм як метод кластеризації для створення філогенетичних дерев [31]. Зазвичай, цей метод використовується для побудови дендрограм на основі даних послідовності ДНК або білка, а його алгоритм потребує розрахунку генетичної відстані між кожною парою таксонів;

- методи, що розглядають ознаки. Ці методи порівнюють усі послідовності одночасно, розглядаючи один символ/сайт за раз. Методи використовують ймовірність і враховують варіації набору послідовностей. До таких методів належать метод максимальної ймовірності та метод максимальної парсимонії, який був використаний у роботі.

Для перевірки достовірності побудованих дендрограм у 1985 році було запропоновано використовувати бутстреп аналіз [32]. Цей метод знайшов широке застосування у філогенетичних дослідженнях організмів, хоча деякі вчені заперечували його достовірність [33]. Бутстреп аналіз є комп'ютерним методом для оцінки точності майже будь-якої статистичної оцінки. Він особливо корисний для оцінки складних непараметричних параметрів, де аналітичні методи є непрактичними. У приміненні до аналізу достовірності побудованих філогенетичних дерев використання бутстрепу забезпечує оцінку достовірності для кожної кладки побудованого дерева на основі частки бутстреп-дерев, що показують ту саму кладку.

У представленій роботі були проведені дослідження генетичної подібності між представниками трьох родів, а саме *Saccharomyces* і *Kluveromyces*, що відносяться до *Ascomycota*, та *Rhodotorula*, представники *Basidiomycota*. Маркерами порівняння слугували нуклеотидні послідовності консервативних ділянок геномів, які використовують для родової та видової ідентифікації еукаріотичних мікроорганізмів, зокрема дріжджів. До таких локусів належать гени рРНК великої та малої субодиниць рибосом та спейсерна ділянка між генами рРНК.

3.1.1. Результати аналізу генетичної подібності видів *Ascomycota* і *Basidiomycota* з використанням методу максимальної парсимонії

Як було зазначено вище, метод максимальної парсимонії відноситься до методів, які враховують відмінності у кожному сайті сиквенсів, за якими проводять порівняння.

На основі сиквенсів гену рРНК малої субодиниці рибосоми було побудовано філогенетичне дерево, представлене на рис. 3.2.

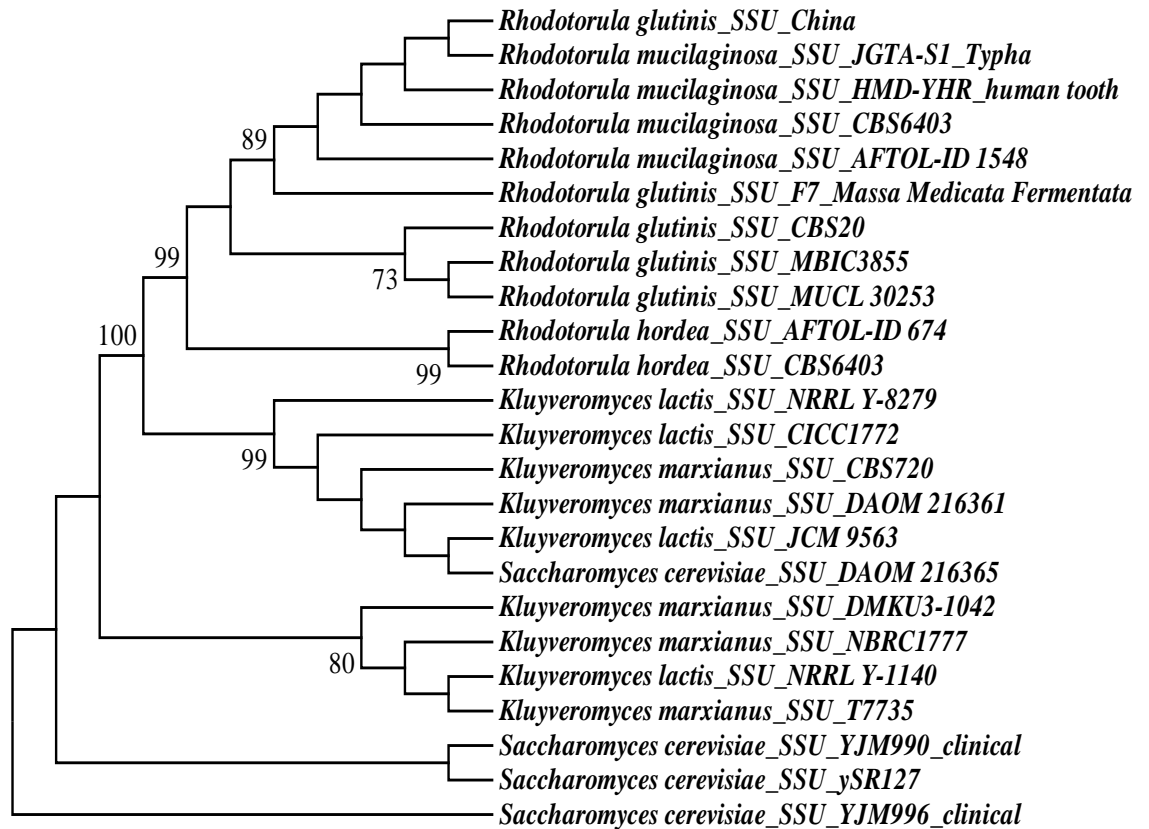


Рис. 3.2. Дендрограма генетичної подібності між видами родів *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* і *Rhodotorula*, побудована на основі сиквенсів гену 18S рРНК з використанням алгоритму максимальної парсимонії. Величина бутстреп-аналізу = 1000 реплік.

Як видно з рисунку, на дендрограмі досліджувані штами, головним чином, утворюють групи відповідно до своєї видової приналежності. Однак, необхідно відмітити, що хоча б один представник кожного виду розташовується у групі іншого виду або й роду. Так, штам *S.cerevisiae* DAOM 216365 розташовується в одному кластері з видами роду *Kluyveromyces*, а штам *R.glutinis* China об'єднується зі штамами виду *R.mucilaginosa*. Така кластеризація, що не відповідає загальній схемі, а саме об'єднання в кластери однієї видової приналежності, може бути зумовлена або ж підвищеним рівнем геномної мінливості штаму, або ж помилками у процесі сиквенування.

Дендрограми філогенетичних взаємозв'язків між представниками *Ascomycota* і *Basidiomycota* були також побудовані на основі сиквенсів гену 26S рРНК та ITS-послідовності. Вони представлені на рис.3.3 і 3.4.

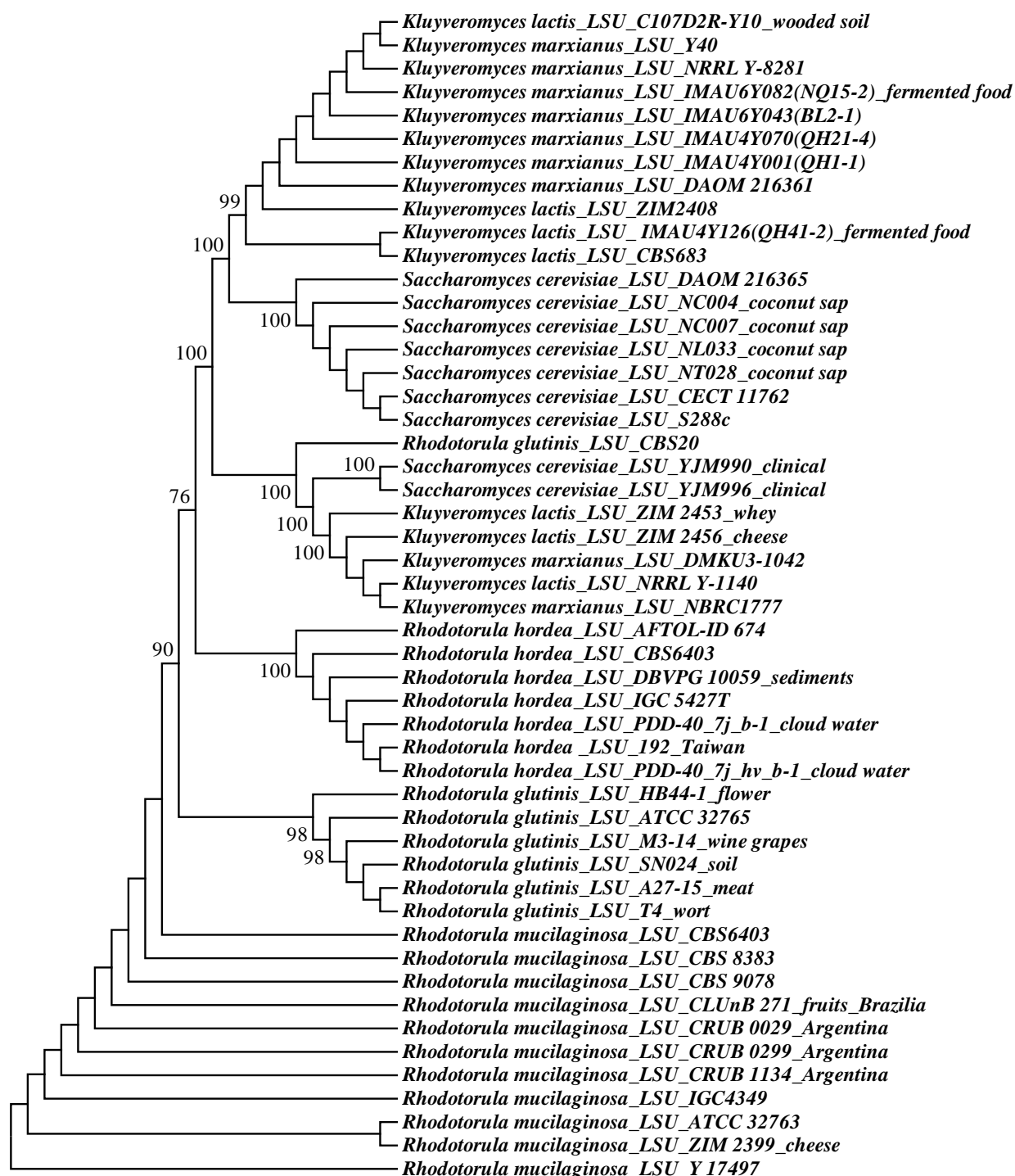


Рис. 3.3. Дендрограма генетичної подібності між видами родів *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* і *Rhodotorula*, побудована на основі сиквенсів гену 26S рРНК з використанням алгоритму максимальної парсимонії. Величина бутстреп-аналізу = 1000 реплік.

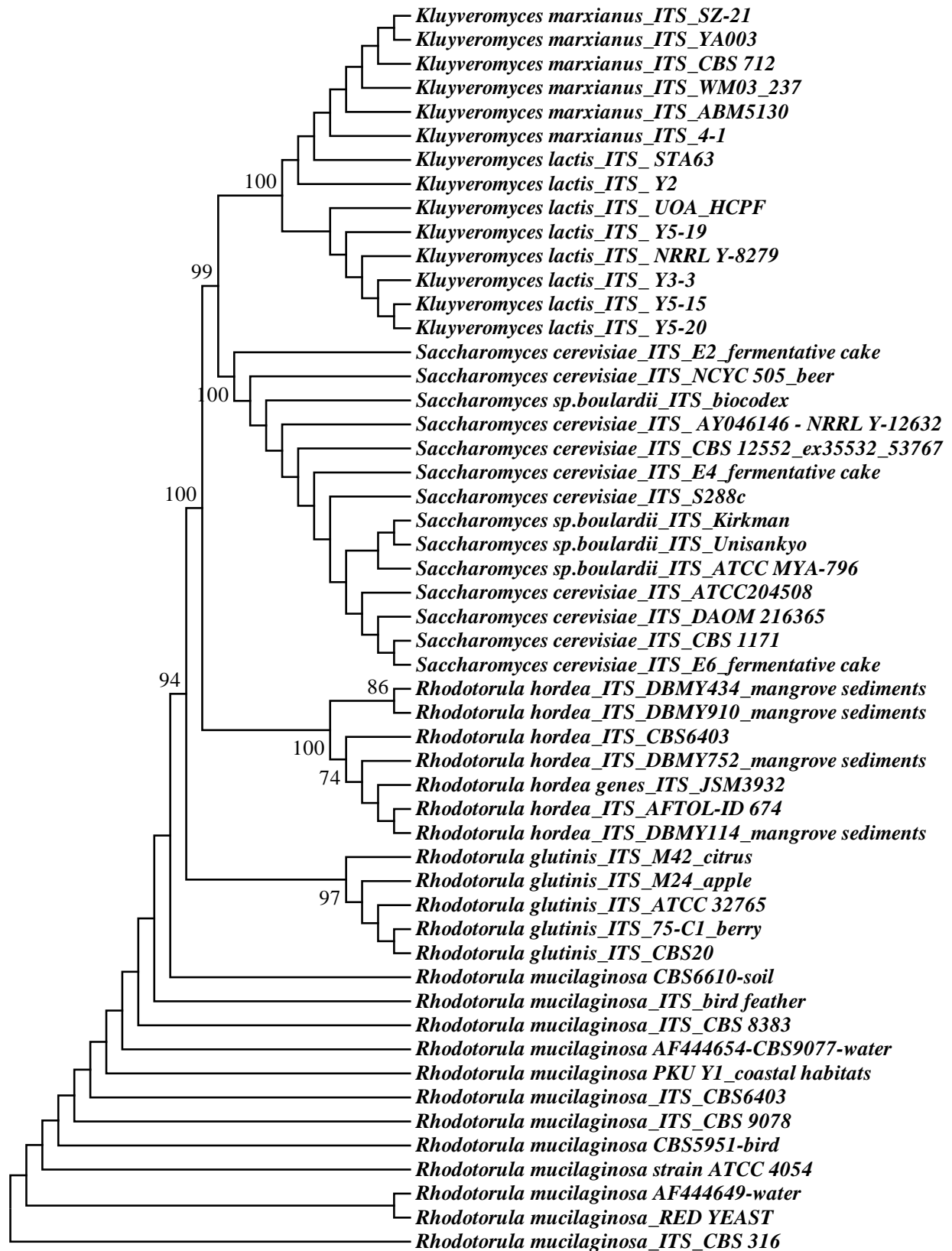


Рис. 3.4. Дендрограма генетичної подібності між видами родів *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* і *Rhodotorula*, побудована на основі сиквенсів ITS-послідовності з використанням алгоритму максимальної парсимонії. Величина бутстреп-аналізу = 1000 реплік.

Аналіз цих філогенетичних дерев показав, що, як і у випадку гену 18S рРНК, кластеризація відповідно до видової приналежності спостерігається для переважної більшості штамів мікроорганізмів. Це яскраво виражено для видів *R. hordea*, *K.marxianus* (26S рРНК), види роду *Rhodotorula* (ITS). Однак, для деяких видів такої чіткої кластеризації не виявлено: *R.musilaginosa* (26S рРНК, ITS), види роду *Kluuveromyces* (ITS).

Отже, використання методу максимальної парсимонії для дослідження генетичної подібності між трьома родами *Saccharomyces*, *Kluuveromyces* і *Rhodotorula* дозволяє розмістити досліджувані штами відповідно до родової та видової приналежності на побудованих дендрограмах. Однак, необхідно також враховувати, що така кластеризація не є абсолютною: ймовірно, це зумовлено різними темпами мікроеволюційних процесів, а не мінімальними змінами, на яких ґрунтується даний алгоритм.

3.1.2. Результати аналізу генетичної подібності видів *Ascomycota* і *Basidiomycota* з використанням методу об'єднання найближчих сусідів

Метод об'єднання найближчих сусідів є одним з методів кластерного аналізу. Початковим етапом для побудови філогенетичних дерев у цьому випадку є розрахунок величин генетичної відстані між дослідними зразками. За допомогою програми MEGA 7 були розраховані значення генетичної відстані між представниками одного роду (внутрішньородові), так і між представниками різних родів (міжродові або інтерродові). Розрахунок генетичних відстаней здійснювали на основі нуклеотидних послідовностей трьох консервативних локусів окремо.

Внутрішньородове порівняння. Результати проведених розрахунків виявили, що за порівняння сиквенсів гену 18S рРНК найменше значення показнику генетичної відстані серед представників одного роду відмічено між штамми роду *Rhodotorula* і становить 0.012, а найбільше – роду

Saccharomyces зі значенням 0.776. Слід також відмітити, що значення для роду *Kluuveromyces* подібне до такого для *Saccharomyces*, 0.710.

Аналіз значень генетичної відстані на основі нуклеотидних послідовностей гену 26S рРНК показав результати з подібною тенденцією: максимальне значення відмічено для *Saccharomyces*, а найменше – для представників роду *Rhodotorula*.

На відміну від значень генетичної відстані за порівняння сиквенсів генів рРНК великої і малої субодиниць рибосом значення цього показника за використання ITS-послідовності були максимальними для роду *Rhodotorula*, а мінімальними – роду *Saccharomyces*.

У таблиці 3.3 наведені зведені дані значень генетичної відстані для всіх варіантів аналізу.

Таблиця 3.3

Значення генетичної відстані, розраховані для представників трьох родів на основі нуклеотидних послідовностей консервативних ділянок геномів (внутрішньородова мінливість)

Рід	Внутрішньородова мінливість		
	18S рРНК	26S рРНК	ITS
<i>Saccharomyces</i>	0.776	0.560	0.006
<i>Kluuveromyces</i>	0.710	0.552	0.019
<i>Rhodotorula</i>	0.012	0.194	0.232

Міжродове порівняння. Аналіз генетичних відстаней між представниками різних родів виявив, що найбільші відмінності між родами відмічені за порівняння сиквенсів ITS-послідовності. Тобто найкращу родову диференціацію можна спостерігати при застосуванні цього маркеру.

Результати міжродового порівняння значень генетичних відстаней для кожного роду наведено у табл. 3.4.

Значення генетичної відстані, розраховані для представників трьох родів на основі нуклеотидних послідовностей консервативних ділянок геномів (міжродова мінливість)

А			
Локуси	18S рРНК	26S рРНК	ITS-послідовність
	<i>Saccharomyces</i> vs		
<i>Kluyveromyces</i>	0.560	0.513	1.059
<i>Rhodotorula</i>	0.709	0.558	1.793
Б			
Локуси	18S рРНК	26S рРНК	ITS-послідовність
	<i>Kluyveromyces</i> vs		
<i>Saccharomyces</i>	0.560	0.513	1.059
<i>Rhodotorula</i>	0.569	0.645	0.624
В			
Локуси	18S рРНК	26S рРНК	ITS-послідовність
	<i>Rhodotorula</i> vs		
<i>Saccharomyces</i>	0.709	0.558	1.793
<i>Kluyveromyces</i>	0.569	0.645	0.624

Примітка. А – порівняння для роду *Saccharomyces*; Б – порівняння для роду *Kluyveromyces*; В – порівняння для роду *Rhodotorula*.

За величиною генетичної відстані найближчими за трьома локусами виявились роди *Saccharomyces* і *Kluyveromyces*, а найбільш віддаленими – *Saccharomyces* і *Rhodotorula*.

Аналіз філогенетичних дерев, побудованих на основі алгоритму об'єднання найближчих сусідів. На основі значень величин генетичної

відстані, отриманих для представників трьох родів мікроорганізмів та трьох консервативних локусів геномів, були побудовані дендрограми генетичної подібності (рис. 3.5.; 3.6; 3.7.)

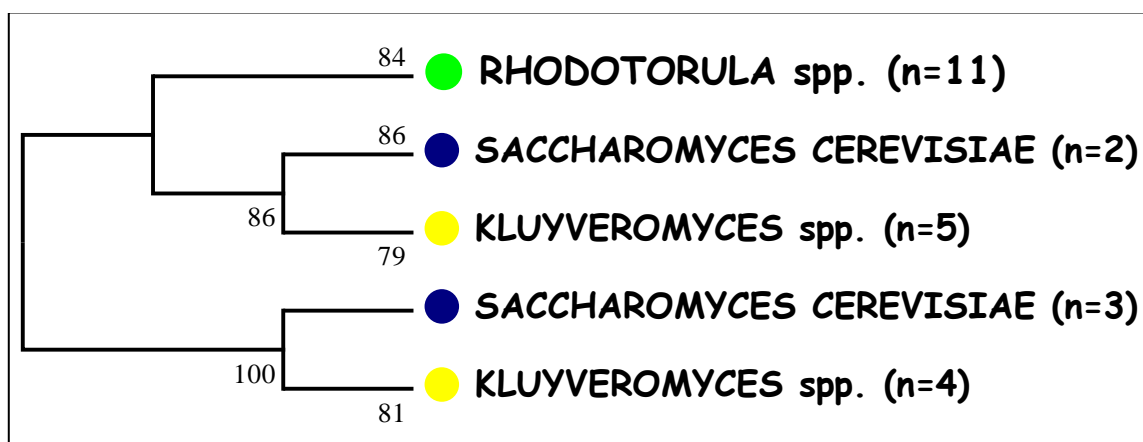


Рис. 3.5. Дендрограма спорідненості видів родів *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, побудована на основі послідовностей гену 18S рРНК, з використанням методу об'єднання найближчих сусідів (2-параметрична модель Кімури): стислий вигляд.

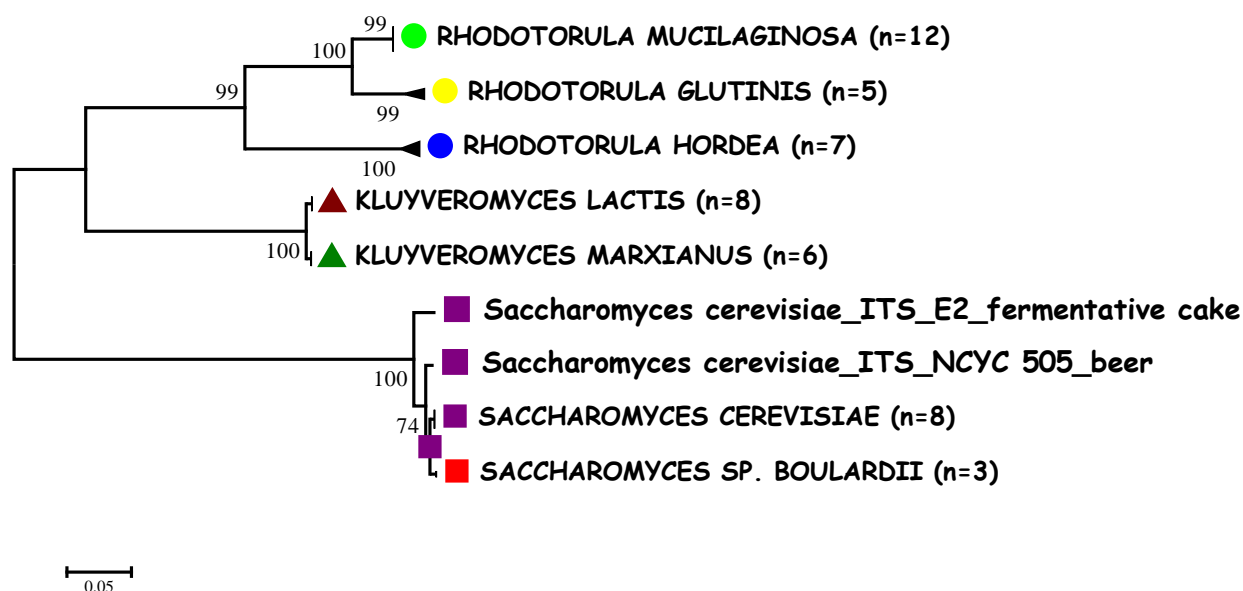
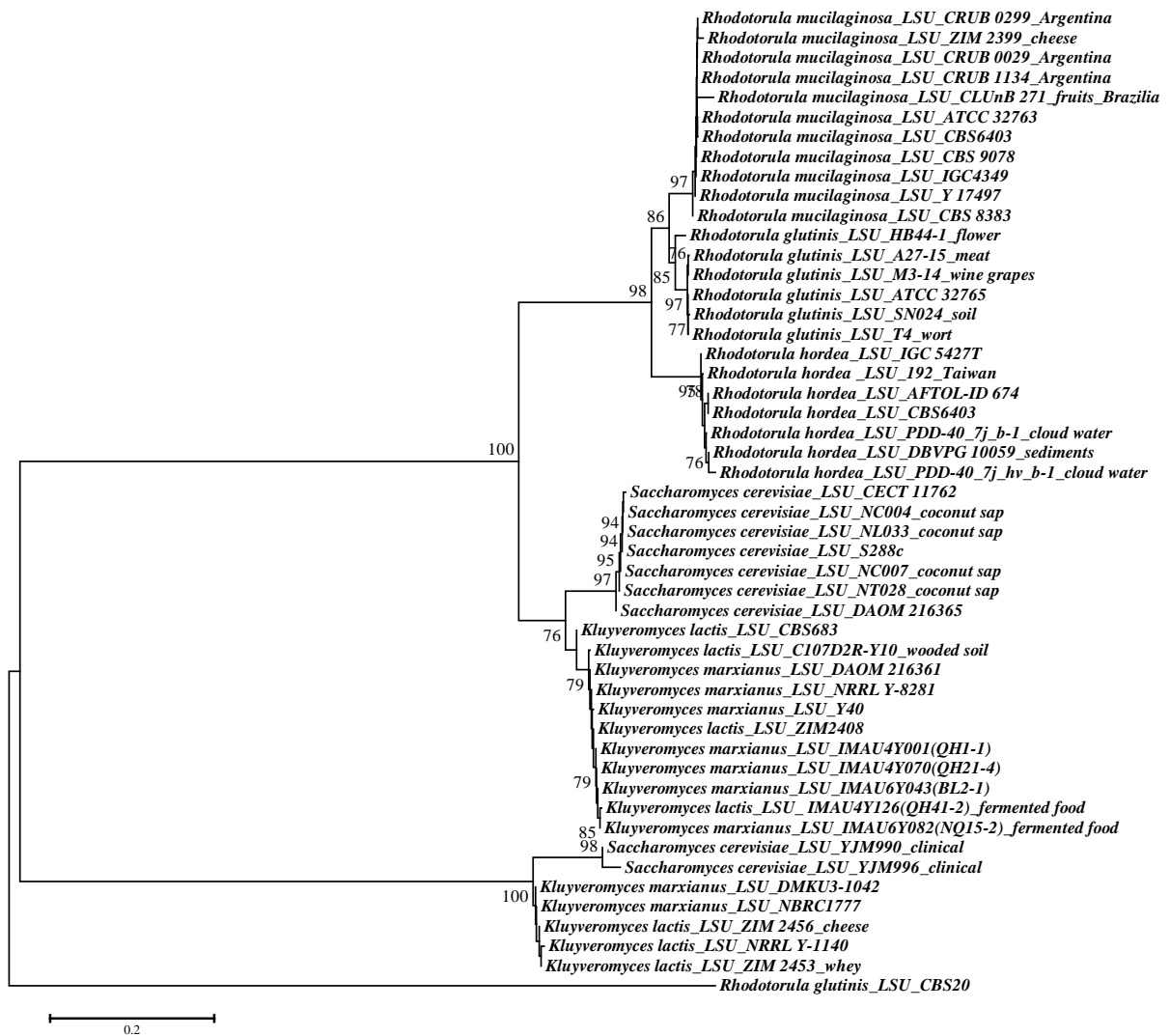
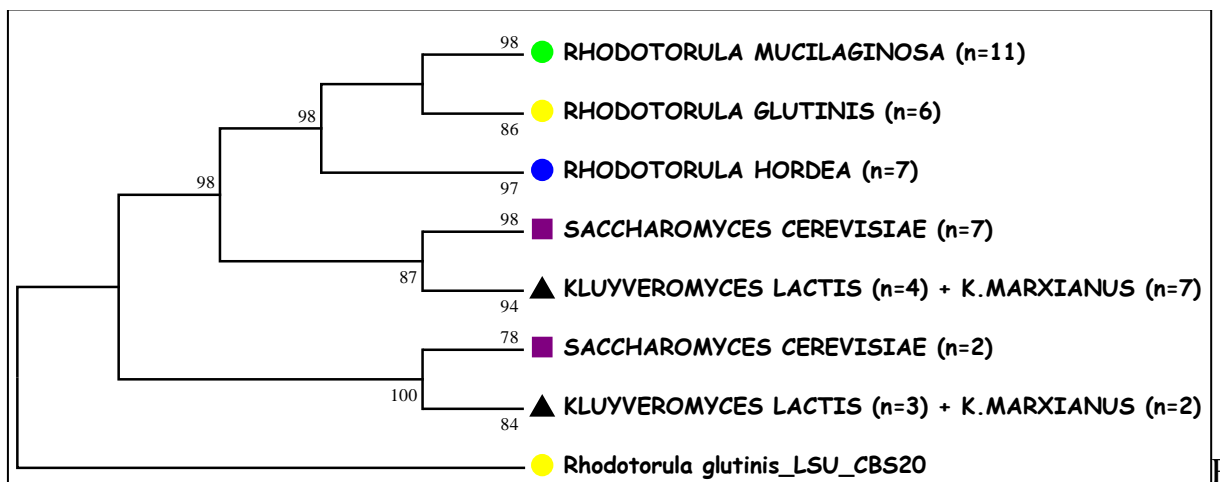


Рис. 3.6. Дендрограма подібності між видами *Ascomycota* та *Basidiomycota*, побудова на основі сиквенсів ITS-послідовності з використанням методу об'єднання найближчих сусідів (2-параметрична модель Кімури), стислий вигляд



A



B

Рис. 3.7. Дендрограма спорідненості видів родів *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, побудована на основі послідовностей гену 26S рРНК, з використанням методу об'єднання найближчих сусідів (2-параметрична модель Кімури): розгорнутий (А) та стислий (Б) вигляд.

Результати порівняльного аналізу трьох філогенетичних дерев показали, що найкращу видову диференціацію отримано за використання ITS-послідовності: всі досліджувані штами згрупувались відповідно до видової приналежності. За використання генів рРНК великої та малої субодиниць рибосом виявлено змішані кластери, сформовані видами родів *Saccharomyces* та *Kluyveromyces*.

Також у даній роботі побудовано дендрограму спорідненості видів *Ascomycota* та *Basidiomycota* на основі конкатенованих сиквенсів трьох консервативних ділянок геномів (рис. 3.8.).

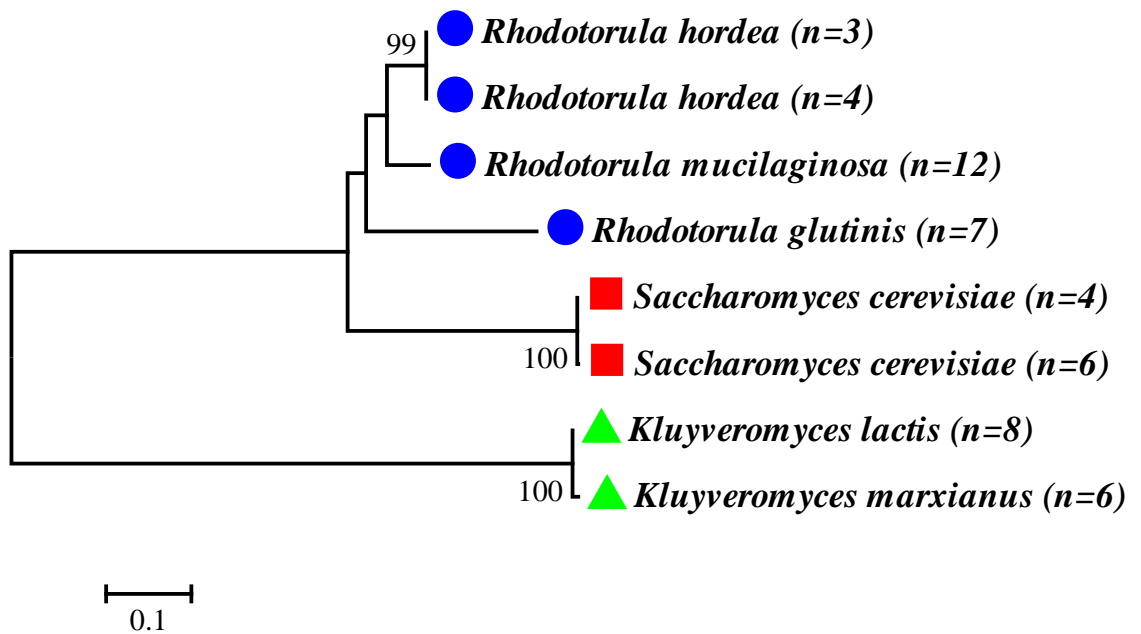


Рис.. 3.8. Дендрограма спорідненості видів родів *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, побудована на основі конкатенованих послідовностей трьох локусів (18S рРНК, 26S рРНК, ITS), з використанням методу об'єднання найближчих сусідів (2-параметрична модель Кімури).

На рис. 3.8. видно чітку видову та родову диференціацію досліджуваних мікроорганізмів.

3.2. Аналіз нуклеотидних послідовностей 18S рРНК, 26S рРНК генів та ITS-послідовності

Аналіз генетичної спорідненості між різними організмами та їх філогенетичних взаємозв'язків шляхом побудови дендрограм та розрахунку відстані, безумовно, має свої переваги: можливість одночасно проаналізувати великі масиви даних та виявити близькоспоріднені або віддалені організми. Також дендрограми генетичної подібності на основі консервативних локусів геному використовують для уточнення видової приналежності мікроорганізмів у випадку високого відсотку схожості з представниками декількох видів. Методи кластерного аналізу також набули широкого застосування для аналізу мінливості на рівні популяцій.

Однак, такі узагальнюючі методика не дозволяють більш детально аналізувати нуклеотидні послідовності, виявляти сайти або ділянки, що можуть бути використані як індивідуальні або групові ДНК-маркери, або ж пояснювати виняткові переміщення штамів одного виду до кластеру іншого, як було показано у даній роботі.

Все це зумовило провести більш детальний аналіз нуклеотидних послідовностей консервативних локусів геномів досліджуваних організмів.

У результаті порівняльного аналізу нуклеотидних послідовностей генів 18S рРНК, 26S рРНК та ITS-послідовності у різних видів родів *Saccharomyces*, *Kluveromyces* і *Rhodotorula* охарактеризовано кількість консервативних, варіабельних, парсимоній-інформативних та синглетонних сайтів. У таблиці 3.5 представлені дані за умови порівняльного аналізу всіх дослідних штамів.

Найбільш варіабельними виявились послідовності 26S рРНК, відсоток варіабельних сайтів 74%, що свідчить на користь використання цих сиквенсів для вивчення мікроеволюційних процесів та використання їх для дослідження мінливості у близькоспоріднених видів. Найменший рівень гетерогенності ДНК послідовностей властивий гену 18S рРНК та ITS ділянці:

відсоток синглетонних сайтів < 1%. Це може свідчити про низький рівень мутаційних процесів та низькі темпи еволюційних подій у цих локусах.

Таблиця 3.5

Порівняльна характеристика нуклеотидних послідовностей консервативних локусів у представників *Ascomycota* та *Basidiomycota*

Характеристика (сайти)	Локуси		
	18S рРНК	26S рРНК	ITS
Варіабельні	43%	74%	61%
Парсимоній-інформативні	42%	31%	57%
Синглетон-сайти	< 1%	43%	< 1%

3.3. Порівняльний аналіз результатів за використання двох підходів

Дендрограми, отримані методами максимальної парсимонії та об'єднання найближчих сусідів мали однакову топологію, відмінності спостерігали лише в індексах бутстреп-аналізу. Залучені до роботи алгоритми розрахунку генетичної подібності трьох родів дріжджів, загалом, диференціюють штами між різними кластерами відповідно до їх видової приналежності. Чітку диференціацію досліджуваних дріжджів на роди і види виявляли за використання ITS-послідовностей та конкатенованих сиквенсів трьох консервативних ділянок [34].

Детальний аналіз та характеристика сиквенсів генів 18S рРНК, 26S рРНК та ITS-послідовності дозволяє виявити певні сайти, за якими спостерігається відмінність між видами трьох родів, а також порівняти рівні мінливості консервативних ділянок. За отриманими у роботі результатами, відмічені різні рівні мінливості у трьох ділянках: найбільш варіабельними виявились ділянки гену рРНК великої субодиниці рибосом, що свідчить про

високі темпи мікроеволюційних процесів у порівнянні з двома іншими локусами. Про це ж свідчить і показник кількості синглетонних сайтів.

Висновок до розділу 3:

Використані у роботі алгоритми та методи аналізу ДНК-послідовностей консервативних ділянок геномів видів *Ascomycota* та *Basidiomycota* дозволили припустити, що алгоритми побудови філогенетичних дерев ефективні для диференціації мікроорганізмів відповідно до їх родової та видової приналежності. Порівняльний аналіз і характеристика цих послідовностей щодо кількості консервативних та варіабельних сайтів виявив сайти та ДНК-маркери (консервативні локуси, які розглядались у роботі), придатні для підбору родо- та видоспецифічних маркерів. Обидва підходи доповнюють один одного та надають комплексну інформацію щодо спорідненості досліджуваних мікроорганізмів.

ВИСНОВКИ

1. На основі нуклеотидних послідовностей генів 18S рРНК, 26S рРНК та ITS-послідовностей, задепонованих у базах даних GenBank і AFTOL, проведено молекулярно-філогенетичний аналіз між видами *Ascomycota* і *Basidiomycota*.

2. Дендрограми, побудовані методами максимальної парсимонії та об'єднання найближчих сусідів демонструють однакову топологію, відмінності спостерігаються лише в індексах бутстреп-аналізу

3. Чітка диференціація досліджуваних дріжджів на роди і види відбувається за використання ITS-послідовностей, а також при об'єднанні всіх трьох послідовностей (18S рРНК, 26S рРНК, ITS).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Warringer J. et al. Trait variation in yeast is defined by population history // *PloS genetics*. 2011. Vol. 7. №6. P. e1002111.
2. Engel S.R., Cherry J.M. The new modern era of yeast genomics: community sequencing and the resulting annotation of multiple *Saccharomyces cerevisiae* strains at the Saccharomyces Genome Database // *Database*. 2013. Vol. 2013.
3. Goffeau A. et al. Life with 6000 genes. *Science* 1996. 274:546, 563–567.
4. Grigoriev IV, Cullen D, Goodwin SB et al. Fueling the future with fungal genomics. *Mycology* 2011. 2:192–209.
5. Boeckmann B, Marcet-Houben M, Rees JA, et al. Quest for Orthologs Species Tree Working Group. Quest for orthologs entails quest for tree of life: in search of the gene stream. *Genome Biol Evol* 2015. 7:1988–1999 <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evv121>.
6. Li L, Stoeckert CJ Jr, Roos DS. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res* 2003. 13:2178–2189 <http://dx.doi.org/10.1101/gr.1224503>.
7. Eddy SR. Accelerated profile HMM searches. *PLOS Comput Biol* 2011. 7:e1002195 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002195>.
8. Shen XX, Hittinger CT, Rokas A. Contentious relationships in phylogenomic studies can be driven by a handful of genes. *Nat Ecol Evol* 2017. 1:0126 <http://dx.doi.org/10.1038/s41559-017-0126>.
9. Mirarab S, Reaz R, Bayzid MS, Zimmermann T, Swenson MS, Warnow T. ASTRAL: genome-scale coalescent-based species tree estimation. *Bioinformatics* 2014. 30:i541–i548 <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu462>.
10. Walker WF. 5S ribosomal RNA sequences from ascomycetes and evolutionary implications. *Syst Appl Microbiol* 1985;6:48–53.

11. Kurtzman CP, Robnett CJ. Relationships among genera of the Saccharomycotina (Ascomycota) from multigene phylogenetic analysis of type species. *FEMS Yeast Res* 2013;13:23–33.
12. Kuramae EE, Robert V, Snel B, et al. Phylogenomics reveal a robust fungal tree of life. *FEMS Yeast Res* 2006b;6:1213–20.
13. Rokas A, Williams BL, King N, et al. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* 2003;425:798–804.
14. James TY, Kauff F, Schoch CL, et al. Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 2006;443:818–22.
15. Boekhout T, Fonseca Á, Sampaio JP, et al. Discussion of teleomorphic and anamorphic basidiomycetous yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (eds). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5th edn. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2011, 1339–72.
16. Fell JW, Boekhout T, Fonseca Á, et al. Basidiomycetous yeasts. In: Esser K, Lemke PA (eds). *The Mycota, A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research, Vol II, Systematics and Evolution, Part B*. Berlin: Springer, 2001, 3–35.
17. Scorzetti G, Fell JW, Fonseca A, et al. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Res* 2002;2:495–517.
18. Sampaio JP. Diversity, phylogeny and classification of basidiomycetous yeasts. In: Agerer R, Piepenbring M, Blanz P (eds). *Frontiers in Basidiomycete Mycology*. Eching: IHW, 2004, 49–80.
19. Wang Q-M, Begeerw D, Groenewald M, et al. Multigene phylogeny and taxonomic revisions of yeasts and related fungi in Ustilaginomycotina. *Persoonia* 2015, submitted.
20. Inácio J, Landell MF, Valente P, et al. *Farysizyma* gen. Nov., an anamorphic genus in the Ustilaginales to accommodate three novel epiphytic basidiomycetous yeast species from America, Europe and Asia. *FEMS Yeast Res* 2008;8:499–508.

21. Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Anton Leeuw 1998;73:331–71.

22. Kurtzman CP, Robnett CJ. Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. FEMS Yeast Res 2003;3:417–32.

23. Fell JW, Boekhout T, Fonseca Á, et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. Int J Syst Evol Micr 2000;50:1351–71.

24. Sugita T, Nishikawa A, Ikeda R, et al. Identification of medically relevant Trichosporon species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for Trichosporon identification. J Clin Microbiol 1999;37: 1985–93.

25. Kurtzman CP, Robnett CJ. Three new anascosporic genera of the Saccharomycotina: Danielozyma gen. nov., Deakozyma gen. nov. and Middelhovenomyces gen. nov. Anton Leeuw 2014;105:933–42.

26. Kurtzman CP, Robnett CJ. Multigene phylogenetic analysis of the Trichomonascus, Wickerhamiella and Zygoascus yeast clades, and the proposal of Sugiyamaella gen.nov. and 14 new species combinations. FEMS Yeast Res 2007;7:141–51.

27. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. P Natl Acad Sci USA 2012;109:6241–6.

28. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution. 2016. Vol.33. P.1870-1874

29. Baum, D. (2008) Reading a Phylogenetic Tree: The Meaning of Monophyletic Groups. Nature Education 1(1):190

30. David, L. (2016). Advanced methods to solve the maximum parsimony problem (Doctoral dissertation, Angers)

31. N. Saitou and M. Nei. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4):406–425, 198

32. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap //*evolution*. 1985. Т. 39. №. 4. P. 783-791.

33. Hillis D. M., Bull J. J. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis //*Systematic biology*. 1993. Т. 42. №. 2. P. 182-192

34. Yarmolenko M.V., Zelena L.B., Hretsky I.O., Tkachuk N.V. Analysis of yeast conservative nucleotide sequences by genomic bioinformatic methods.V Міжнародна науково-практична конференція «Новітні досягнення біотехнології». 22 – 23 вересня 2021 року. Київ, Україна.

ДОДАТОК А

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF UKRAINE
NATIONAL AVIATION UNIVERSITY

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology
S.M. Vynohradsky Society of Microbiologists of Ukraine
Institute of Agroecology and Environmental Management
of NAAS of Ukraine



LATEST ACHIEVEMENTS of BIOTECHNOLOGY
V International Scientific Conference

September 22-23, 2021, Kyiv

- Pharmaceutical biotechnology.
- Industrial biotechnology.
- Molecular biotechnology.
- Ecobiotechnology and bioenergy.
- Biomonitoring and conservation of genetic diversity.
- Intersectoral comprehensive research.
- Agrobiotechnology.
- International scientific-practical seminar "Technical bioenergy and resource saving".
- Theory and methods of teaching biotechnological disciplines.
- Medicines in extreme conditions.
- Bioprotection and biosafety.

A CONFERENCE PROGRAMME

Google Meeting Link:
<https://meet.google.com/dou-pxzr-zgz>

Продовження ДОДАТКУ А

September 22, 2021

Morning programme

Moderator – Kuznietsova O.

- 10:00-10:30 Conference opening. *Chumak V., Garkava K.*
- 10:30-10:40 *Bleha R., Skrynnikova A., Synytsya A. (University of Chemistry and Technology, Prague), Jablonsky I. (University of Life Sciences, Prague).* EVALUATION OF BASIDIOCARPS OF WOOD DECAY MUSHROOMS *Ganoderma sp.* WITH FTIR ATR SPECTROSCOPY
- 10:45-10:55 *Synytsya A., Baeva E., Lavrova E., Sushytskyi L., Bleha R. (University of Chemistry and Technology, Prague), Jablonsky I. (University of Life Sciences, Prague).* FRUITING BODIES OF CULTIVATING MUSHROOM *Pleurotus ostreatus* AS THE SOURCE OF IMMUNE ACTIVE POLYSACCHARIDES
- 11:00-11:10 *Švec I., Běliková E., Skřivan P., Sluková M. (University of Chemistry and Technology, Prague).* MONITORING OF VISCOSITY CHANGES OF WHEAT SOURDOUGH: A PILOT STUDY
- 11:15-11:30 *Andrianova T.V. (M.G. Kholodny Institute of Botany NAS Ukraine, Kyiv; National Aviation University), Konovalchuk V.K. (National University of Life and Environmental Sciences, Kyiv).* TOWARD THE TECHNOLOGY OF LARGE CRANBERRY FRUIT STORAGE THROUGH DECLINING THE FUNGAL ROTS
- 11:35-11:45 *Adamchuk-Chala N.I. (Institute of Agroecology NAAS of Ukraine, Kyiv; National Aviation University, Kyiv), Chala Y.O. (Kyiv National Linguistic University; Junior Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv).* INVESTIGATION OF NATIVE MICROBIAL CENOSES OF *ARABIDOPSIS THALIANA* RHIZOSPHERE IN ARTIFICIAL SUBSTRATES

12:00 – 13:00 **Lunch**

September 22, 2021

Afternoon programme

Moderator – Petyukh G.

- 13:00-13:40 *Kan Wang (Iowa State University, USA).* CRISPR genome-editing as a modern breeding technology: How do we do it?
- 13:45-13:55 *Glushko Yu., Bielikova O., Mruk A. (The Institute of Fisheries of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine), Kozubska-Sobocińska A. (The National Research Institute of Animal Production, Krakow, Poland).* CYTOGENETIC MONITORING OF FRESHWATER AQUACULTURE IN UKRAINE
- 14:00-14:40 *Jaswinder Singh (McGill University, Canada).* DECODING THE OAT GENOME

- 14:50-14:55 Корнієнко І.М. (*Національний авіаційний університет, Київ*), Гуляєв В.М., Анацький А.С., Непошивайленко Н.О. (*Дніпровський державний технічний університет, Кам'янське*), Монченко О.В. (*Національний авіаційний університет, Київ*), Ларичева Л.П., Філімоненко О.Ю. (*Дніпровський державний технічний університет, Кам'янське*). ФУНКЦІОНАЛЬНО-ТЕХНОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЗАМОРОЖЕНИХ ТІСТОВИХ НАПІВФАБРИКАТІВ, КРІОКОНСЕРВАЦІЯ ГОТОВИХ ХЛІБОПРОДУКТІВ
- 14:55-15:00 Yukhnenko M.D. (National Aviation University, Kyiv). SAMPLE ANALYSES FOR VACCINIUM VITIS-IDAEA BIOACTIVE COMPOUNDS EXTRACTION
- 15:00-15:05 Кирик Т.І., Бабій В.О., Гончаренко І.І. (*Національний авіаційний університет, м.Київ*), Михайленко О.В. (*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ*). ЗАСТОСУВАННЯ СРІБЛА У ПІДГОТОВЦІ ТА ОЧИСТЦІ ВОДИ
- 15:05-15:10 Дмитруха Н.М., Лагутіна О.С., Короленко Т.К. (*ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва НАМН України», Київ*). БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ БЕТА – КАРОТИН, ОЦІНКА ТОКСИЧНОСТІ ТА БЕЗПЕЧНОСТІ
- 15:10-15:15 Андрусишина І.М., Голуб І.О., Лампека О.Г. (*ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І.Кундієва НАМН»,м.Київ*). СУЧАСНИЙ СТАН ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ МІКРОЕЛЕМЕНТАМИ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ УКРАЇНЦІВ
- 15:15-15:20 Rogalsky S.P., Tarasyuk O.P. (*V. P. Kukhar Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of NASU, Kyiv*), Lyoshina L.G., Bulko O.V., Kuchuk M.V. (*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of NASU, Kyiv*). STIMULATING EFFECT OF GUANIDINIUM-BASED CATIONIC POLYMER ON WHEAT SEEDLINGS GROWTH
- 15:20-15:25 Рогальський С.П., Тарасюк О.П., Джужа О.В., Бодачівська Л.Ю., Венгер І.О., Папейкін О.О. (*Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАНУ, Київ*). БІОДЕСТРУКТИВНИЙ ПЛАСТИФІКАТОР ДЛЯ ПОЛІВІНІЛХЛОРИДУ НА ОСНОВІ ТРЕТИННОГО АМІДУ УНДЕЦЕНОВОЇ КИСЛОТИ
- 15:25-15:30 Voronkova O.S., Voronkova Yu.S., Vinnikov A.I., Shevchenko T.M. (*Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro*). ANTAGONISTIC ACTIVITY OF PROBIOTIC STRAIN OF LACTOBACILLUS AGAINST OPPORTUNISTIC BACTERIA DURING DYSBIOSIS OF INTESTINE
- 15:30-15:35 Поштаренко А.В., Решетняк Л.Р. (*Національний авіаційний університет, Київ*). ВПЛИВ НИЗЬКОЧАСТОТНИХ ПОЛІВ НА ПРОЦЕС ОЧИЩЕННЯ ДРІЖДЖОВМІСНИХ СТИЧНИХ ВОД
- 15:35-15:40 Yarmolenko M.V. (*Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv*), Zelena L.B., Hretsky I.O. (*Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv; Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*), Tkachuk N.V. (*T.H. Shevchenko National University "Chernihiv Colehium", Chernihiv*). ANALYSIS OF YEAST CONSERVATIVE NUCLEOTIDE SEQUENCES BY GENOMIC BIOINFORMATIC METHODS.

TOPICAL TENDENCIES OF SCIENCE AND PRACTICE

9.	Коломиец В.А. ЭТАПЫ ВЫПОЛНЕНИЯ ЗАДАНИЯ «АКВАРЕЛЬНАЯ ОТМЫВКА ГЕОМЕТРИЧЕСКИХ ТЕЛ С РАЗНЫМИ ЦВЕТО-ФАКТУРНЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ И МАТЕРИАЛАМИ НА ПРИМЕРЕ НАТЮРМОРТА»	55
10.	Коломиец В.А. ТЕХНИКА «КУМИКО». ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В ДИЗАЙНЕ ИНТЕРЬЕРОВ. ТРЕНИРОВОЧНЫЕ УПРАЖНЕНИЯ В ЭТОЙ ТЕХНИКЕ	64
11.	Лихачова О.І., Голіус В.А. ІНТЕРФЕЙС У ГЕЙМ-ДИЗАЙНІ	71
12.	Слуцький В.С. ЗАРОДЖЕННЯ ТЕАТРУ БЕРГОНЬЄ	75
BIOLOGICAL SCIENCES		
13.	Heybatova N., Nasibova A. EPR STUDIES OF THE EFFECT OF IONIZING GAMMA RADIATION ON PELVIC GRAPE SNAILS (HELIX POMATIA LINNAEUS)	80
14.	Petrovska T., Hretskyi I. SIMULATION OF PROTEIN STRUCTURE AD INITIO	82
15.	Taran O., Savchuk M., Didur E., Kovalenko N. EXPRESS-ANALYSIS OF THE PHYSIOLOGICAL STATUS OF PLANTS DURING VIRAL INFECTION USING A PORTABLE CHRONOFLUOROMETER	84
16.	Герасимчук О.А. СУЧАСНА СИСТЕМА ПТАХІВ І ВИВЧЕННЯ ЦЬОЇ ТЕМИ У ШКІЛЬНОМУ КУРСІ	90
17.	Горчакова В.В. СУЧНАСА СИСТЕМАТИКА РИБ І ВИВЧЕННЯ ЦЬОЇ ТЕМИ У ШКІЛЬНОМУ КУРСІ	92

Yarmolenko M.V.¹, Zelena L.B.^{1,2}, Hretsky I.O.^{1,2}, Tkachuk N.V.³

¹Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv

²Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

³T.H. Shevchenko National University "Chernihiv Colehium", Chernihiv

ANALYSIS OF YEAST CONSERVATIVE NUCLEOTIDE SEQUENCES BY GENOMIC BIOINFORMATIC METHODS.

One of the first microorganisms used by humans to meet food and beverage needs was yeast. Yeasts are the simple eukaryotic microorganism that has a wide range of applications in various industries [1]. Due to their ability to synthesize many products, such as ethanol, enzymes, vitamins, yeasts are extensively used as a model for the production of different metabolic products beneficial for human health. Besides yeasts are also used for genetic construction of the producers of recombinant proteins and metabolites. It has been defined three fields of yeast application in modern biotechnology: production of metabolites, production of recombinant proteins, and *in vivo* biotransformations [2].

The development of genomic, proteomic and bioinformatic methods has introduced into the biotechnological processes the new instruments to explore the industrial potential of organisms and deeper understanding of yeast metabolic pathways and their genetic basis.

The purpose of the present study was the bioinformatic analysis of conservative nucleotide sequences, their variability between different yeast species and genus. To meet this aim 18S rRNA and 26S rRNA genes sequences of 10 strains of *Saccharomyces cerevisiae*, 3 strains of *S. boulardii*, 8 strains of *Kluyveromyces lactis* 6 strains of *K. marxianus*, 12 strains of *Rhodotorula mucilaginosa*, 7 strains of *R.hordea* and 7 strains of *R.glutinis* were analyzed using Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software [3].

The results of bioinformatic analysis showed that the highest percent of variable and parsimony-informative sites were detected when sequences of 26S rRNA gene were compared: 74% and 31%, respectively. Opposite data were revealed for the intragenus genetic variability value, the highest meaning was observed at the comparison of 18S rRNA gene sequences: 0.776 (*Saccharomyces*), 0.710 (*Kluyveromyces*) and 0.012 (*Rhodotorula*).

The results obtained in the study can facilitate the selection of yeast phylogenetic biomarkers and promote the establishment of yeast sequences database.

References

1. Nandy, S. K., & Srivastava, R. K. (2018). A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications. *Microbiological research*, 207, 83-90.
2. Mattanovich, D., Sauer, M., & Gasser, B. (2014). Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks. *Microbial cell factories*, 13(1), 1-5.
3. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.