https://doi.org/10.15407/frg2024.03.266

УДК 004.2:575.113.1:577.152.34: 582.282.232

БІОІНФОРМАТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ВАКУОЛЯРНИХ ПРОТЕАЗ В У ДРІЖДЖІВ *SCHEFFERSOMYCES STIPITIS*

Л.В. ПОЛІЩУК, М.О. ФОМІНА

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України
03143 Київ, вул. Академіка Заболотного, 154
e-mail: LVPolishchuk@ukr.net

Досліджували геноми представників царства Fungi щодо поширеності в них послідовностей, подібних послідовності амплікону штаму ксилозозброджувальних дріжджів *Scheffersomyces stipitis* UCM Y-2810 та визначали рівень їх генетичної спорідненості. Штам дріжджів *Scheffersomyces stipitis* UCM Y-2810 було виділено в 2021 р. з трухлявої деревини. Отримано амплікон (567 пн) геномної послідовності ізоляту. В біоінформатичних дослідженнях використано базу даних GenBank «Nucleotide collection» та пакет програм BLASTN на сервері NCBI і проаналізовано тільки послідовності хромосом організмів, нуклеотидна послідовність яких визначена повністю. Виявлені послідовності, що були подібні отриманому амплікону, належали грибам із підвідділу Saccharomycotina (відділ Ascomycota). Відібрані послідовності виявилися винятково фрагментами генів, що детермінують вакуолярні протеїнази В. У геномі кожного грибного організму із отриманої вибірки було по одній послідовності, подібній амплікону. Найбільші показники подібності продемонстрували штами роду *Scheffersomyces*. Встановлено, що молекулярний розмір амплікона *Scheffersomyces stipitis* UCM Y-2810 становить 67,2 % розміру послідовності детермінанти, що кодує домен ферменту *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 з голландської колекції мікроорганізмів WI-KNAW. Відзначено статистично вірогідну сильну позитивну кореляцію між значеннями показників подібності сиквенсів детермінант штамів роду *Scheffersomyces*, що кодують вакуолярні протеази В і фрагменти рибосомальних кластерів (ITS+LSU). Подібні амплікону *Scheffersomyces stipitis* UCM Y-2810 послідовності належали винятково дріжджам підвідділу Saccharomycotina, де найподібнішими були детермінанти, що кодують вакуолярні протеази В штамів роду *Scheffersomyces*. З огляду на кореляційний зв'язок з рибосомальними баркодами для грибів, послідовність гена вакуолярної серинової протеази може розглядатися як допоміжний генетичний маркер для ідентифікації дріжджів роду *Scheffersomyces*.

Ключові слова: *Scheffersomyces,* амплікон, вакуолярна серинова протеаза, ген, ідентичність, покриття.

Цитування: Поліщук Л.В., Фоміна М.О. Біоінформатичне дослідження послідовностей вакуолярних протеаз В у дріжджів *Scheffersomyces stipitis. Фізіологія рослин і генетика.* 2024. **56**, № 3. С. 266—275. https://doi.org/10.15407/frg2024.03.266

Фрагмент ITS рибосомального оперона розглядається як генетичний маркер із найвищою імовірністю успішної ідентифікації для найширшого спектра мікроскопічних грибів, що забезпечує найчіткіше визначений проміжок штрихкоду між ними [1—3]. Крім області ITS, інші генетичні маркери рибосомального оперона (LSU або 28S рРНК, SSU або 18S рРНК) також широко використовуються для ідентифікації грибів [2, 4, 5]. Однак останнім часом послідовності, що детермінують так звані housekeeping гени, які детермінують обов'язкові протеїни (наприклад, β-тубулін, фактор елонгації 1-α (EF-1-α), субодиницю 2 РНК-полімерази II та низку інших) також успішно використовуються для ідентифікації дріжджів [6—9].

Вакуолярні серинові протеази B (EC 3.4.21.48) виконують важливу функцію в метаболізмі дріжджів — вони є головними ферментами в каскаді активізації ферментів у везикулярних клітинних органелах, таких як грибні вакуолі й лізосоми. Вакуолярні серинові протеази B синтезуються як проферменти, молекулярний розмір яких при визріванні зменшується майже вдвічі. Зимогени серинових протеаз є полідоменними протеїнами. Проферменти вакуолярних серинових протеаз B, крім ферментативного домену, містять ще один регуляторний домен. Активні вакуолярні серинові протеази B є односубодиничними глікопротеїнами [10].

У більшості дріжджів вакуолі можуть займати до 20 % об'єму клітини. Вони, залежно від специфічності функціонування, відіграють значну роль у багатьох життєво важливих процесах клітини [11]. Крім того, лізосоми відповідають за внутрішньоклітинне перетравлення макромолекул, зокрема при аутофагії, також здатні виділяти свій вміст під час екзоцитозу. Лізосоми також беруть участь у кількох внутрішньоклітинних сигнальних шляхах, пов'язаних із клітинним метаболізмом і ростом [12].

Попри важливість вакуолярних серинових протеаз для фізіологічних процесів росту дріжджів, наші уявлення про генетичну складову, що кодує цю групу ферментів і її філогенетичну перспективність для ідентифікації цих мікроорганізмів, залишалися дуже обмеженими.

Метою роботи було дослідити геноми представників царства *Fungi* щодо поширеності в них послідовностей, які подібні послідовності амплікона штаму ксилозозброджувальних дріжджів *Scheffersomyces stipitis* UCM Y-2810, та визначити рівень їх генетичної спорідненості.

Методика

Культура дріжджів була виділена в 2021 р. з гнилої деревини (робочий код w18) [13, 14]. Згідно з біохімічною та молекулярно-генетичною ідентифікацією, мікроорганізм належить до виду *Scheffersomyces stipitis* (з пізніше присвоєним кодом Української колекції мікроорганізмів UCM Y-2810) [15]. В дослідженнях використовували як запит № 1 первинну структуру амплікона (567 пн), отриманого з використанням праймерів (Macrogen, Сеул, Південна Корея) F: 5′-CAT

CGA GAA GTT CGA GAA GG-3′ і R: 5′-TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC-3′ (рис. 1).

Як запит № 2 при комп'ютеризованому аналізі використовували сумарну послідовність ITS (OP931914) та LSU (OP931915) штаму *Scheffersomyces stipitis* Y-2810 [15].

В дослідженнях застосовували базу даних GenBank «Nucleotide collection» [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/]. Проаналізовано частину бази даних колекції, що містить інформацію про первинну структуру ДНК організмів царства *Fungi* (taxi:4751). Вирівнювання послідовності проводили за допомогою пакету програм того самого сервера BLASTN [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi]. Ми використали базові налаштування програми BLASTN без змін.

Результати та обговорення

Молекулярно-генетична ідентифікація штаму *Scheffersomyces stipitis* UCM Y-2810 попередньо проведена нами з використанням послідовностей двох генетичних маркерів: ITS (OP931914) і LSU (OP931915), як первинного та вторинного баркодів для мікроскопічних грибів, відповідно [15].

Для підвищення роздільної здатності та підтримки великомасштабної філогенії, як пропонується іншими авторами, було вирішено, по-перше, дослідити грибні геноми на поширеність в них послідовностей, подібних послідовності досліджуваного амплікона *Scheffersomyces stipitis* UCM Y-2810 (запит № 1) та, по-друге, визначити рівень їх подібності [16].

За результатами аналізу бази даних GenBank Internet (Nucleotide collection; Fungi) та за допомогою програми BLASTN (discontiguous megablast) встановлено 383 послідовності (hits), подібні запиту № 1. Послідовності вибірки були молекулярного розміру від 702 пн до 11848804 пн хромосома 1 *Saccharomyces cerevisiae* SY14 (CP029160). Серед виявлених послідовностей 321 були фрагментами повністю сиквенованих хромосом. В кожному геномі грибного організму вибірки виявлено по одній послідовності, подібній дослідженому амплікону.

Показники ідентичності послідовностей варіювали від 99,6 % (*Scheffersomyces stipitis* CBS 6054, Qc = 99,6 %) до 65,5 % (*Candida albicans* SC5314, Qc = 70,0 %). Виявлені послідовності належали грибам з підвідділу Saccharomycotina (відділ Ascomycota). Більшість з них належала дріжджам виду *Saccharomyces cerevisiae* (232 hits).

У вибірці представлені гриби, ізольовані зі зразків, відібраних у різних еконішах і в різних країнах: Швейцарії, Японії, США, Півден-

catcgagaagttcgagaaggccgttccaaaagtcaacgaaaagacccagaacgtcttgggcttgaaggaagc
cgttgacggcctcaaggacgctgtagatggagccaagaaagctgtggctcccttccttgccggtgccagagac
ctcattcccacagatacatcgttgtcttgaaggagtctgcctctgccgacgaaactgccttccacaaggaatgg
gttgccttgaagcacaccgagtcgttggctggtctcgacgaaagtcacgatttttcgcttccaccaaggacttca
agactgagggcggtattgttgactcgtttgacattggctccatcgtcaagggttactccggtttcttccttgagtcc
accatcgacttgattcgtcagaacccattggttgctttcgttgaacaagactccatggtctatgcctcggaattcg
aagttgaaaagggtgctccatggggtttggccagagtctctcacagagagccattgaccttaagctcgttcaatc
agtacttgtacgacaacaacgctggtaagggttccttcaagta

Рис. 1. Нуклеотидна послідовність амплікона ізоляту *Scheffersomyces stipitis* UCM Y-2810

ній Кореї, Німеччині, Україні, Ірландії, Ізраїлі, Китаї, Пакистані, Лівані, Ефіопії, Великій Британії, Словенії, Нігерії, Португалії, Нідерландах, Угорщині, Франції, Індії, Італії і Таїланді. Джерелами виділення мікроорганізмів слугували рослини, ґрунти, вода, промислові об'єкти та клінічні зразки хворих (кров, сеча, мазки) [18].

Відібрані послідовності були фрагментами генів, що детермінують вакуолярні протеїнази B (серинові протеази з родини сублізинів) таксономічно різних грибів,наприклад *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 (PICST_78783), *Scheffersomyces spartinae* (SUB8), *Komagataella phaffii* GS115 (yscB), *Suhomyces tanzawaensis* NRRL Y-17324 (XM_020209961.1), *Candida orthopsilosis* Co 90-125 (CORT_0G04100), *Rhodotorula mucilaginosa* (Rho m 2).

Отриманий нами амплікон *Scheffersomyces stipitis* UCM Y-2810 має молекулярний розмір 567 пн, тоді як для *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054, з відомої голландської колекції мікроорганізмів WI-KNAW, розмір гена PICST_78783, що детермінує зимоген вакуолярної серинової ендопротеази B (ABN67916.1, 544 аа) становить 2027 нуклеотидних пар. Даний фермент має складну доменну організацію.

На рис. 2 представлено розташування послідовності амплікона *Scheffersomyces stipitis* UCM Y-2810 на схемі організації гена PICST_78783 *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054. Молекулярний розмір амплікона *Scheffersomyces stipitis* UCM Y-2810 становить 67,2 % розміру послідовності детермінанти, що кодує домен ферменту *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054.

Було проведено BLASTN-аналіз частини бази даних WGS (*S.* (taxid:766733) на сайті NCBI та виявлено 24 послідовності, що належали штамам різних видів роду *Scheffersomyces* (табл. 1). Досліджувані дріжджі роду *Scheffersomyces* представлені в еконішах на різних континентах, зокрема в США, Німеччині, Японії та Бразилії, а їх джерелами слугували трухлява деревина, комахи, лиманна вода і ґрунт. Більшість штамів із вибірки означені як типовий матеріал [17].

Здатність утилізувати й ферментувати складові клітинних стінок рослин — ксилозу та целобіозу — є комерційно важливою для дріжджів роду *Scheffersomyces* [17—19]. Проведено окрему систематизацію дріжджів цього роду, що враховує різницю в ферментації зазначених вуглеводів. Клада *Scheffersomyces* містить низку штамів, яка розподіляється на 3 субклади відповідно до здатності ферментувати ксилозу та целобіозу [17]. До X-F-субклади віднесені види дріжджів, здатних ферментувати обидва субстрати; штами з C-F субклади утилізують тільки целобіозу; *Scheffersomyces spartinae* — єдиний вид роду, який не

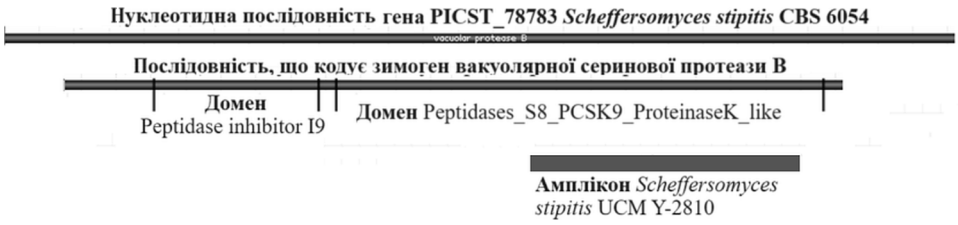

Рис. 2. Схема розташування послідовності амплікона *Scheffersomyces stipitis* UCM Y-2810 на схемі організації гена PICST_78783 *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054

ТАБЛИЦЯ 1. Штами дріжджів роду Scheffersomyces, що досліджувались у роботі за запитами № 1 (досліджуваний амплікон гена вакуолярної серинової протеази) і № 2 (сумарна послідовність ITS+LSU) стосовно штаму S. stipitis UCM Y-2810

Штами дріжджів, що досліджувались у роботі	Контиги, на яких містяться послідовності, подібні запитам		Країна та джерело штаму	Субклади*
Scheffersomyces stipitis CBS 6054	PQNB01000010.1 PQNB01000026.1	Запит № 1 Запит № 2	США, деревина	X-F
Scheffersomyces stipitis NRRL Y-7124 ^{T}	JADGGA010000006.1 JADGGA010000004.1	Запит № 1 Запит № 2	США	X-F
Scheffersomyces illinoinensis NRRL Y-48827 ^{TM}	JAJMAP010000003.1 JAJMAP010000031.1	Запит № 1 Запит № 2	США	X-F
Scheffersomyces segobiensis DSM 27193	JAGSID010000017.1 JAGSID010000072.1	Запит № 1 Запит № 2	Німеччина, грунт	X-F
Scheffersomyces segobiensis NRRL Y-11571^{TM}	JAKTZB010000010.1 JAKTZB010000047.1	Запит № 1 Запит № 2	США	X-F
Scheffersomyces titani CBS 13926 ^{TM}	JAJMBD010000030.1 JAJMBD010000092.1	Запит № 1 Запит № 2	США	НВ
Scheffersomyces insectosa NRRL Y-12854 ^{TM}	JAJMAO010000018.1 JAJMAO010000293.1	Запит № 1 Запит № 2	США	X-F
Scheffersomyces virginianus NRRL Y-48822^{TM}	JAJMAT010000009.1 JAJMAT010000077.1	Запит № 1 Запит № 2	США	X-F
Scheffersomyces shehatae NRRL Y-12858 ^{TM}	JAKTZA010000043.1 JAKTZA01000204.1	Запит № 1 Запит № 2	США	X-F
Scheffersomyces shehatae NBRC1983	BDMP01000006.1 BDMP01000009.1	Запит № 1 Запит № 2	США	X-F
Scheffersomyces shehatae ATY839	BDMO01000001.1 BDMO01000007.1	Запит № 1 Запит № 2	Японія	X-F
Scheffersomyces parashehatae CBS 12535	JAJLYY010000016.1 JAJLYY010000119.1	Запит № 1 Запит № 2	США	НВ
Scheffersomyces quercinus NRRL Y-48825 ^{TM}	JAKTUQ010000002.1 JAKTUQ010000067.1	Запит № 1 Запит № 2	США	X-F
Scheffersomyces xylosifermentans CBS 12540	JAJLYX010000025.1 JAJLYX010000200.1	Запит № 1 Запит № 2	США	НВ
Scheffersomyces cryptocercus NRRL Y-48824 ^{TM}	JANIVO010000007.1 JANIVO010000023.1	Запит № 1 Запит № 2	США	НВ
Scheffersomyces lignosus NRRL Y-12856 ^{TM}	JAKUBS010000010.1 JAKUBS010000036.1	Запит № 1 Запит № 2	США	X-F
Scheffersomyces lignosus JCM 9837	BCGS01000006.1 НВ	Запит № 1 Запит № 2	США	X-F
Scheffersomyces coipomensis NRRL Y-17651^{TM}	JAKTZC010000003.1 JAKTZC010000056.1	Запит № 1 Запит № 2	США	C-F
Candida broadrunensis CBS 11838 ^{TM}	JAJMJS010000006.1 JAJMJS010000116.1	Запит № 1 Запит № 2	США	НВ
Scheffersomyces ergatensis NRRL Y-17652 ^{TM}	JAJMHX010000035.1 JAJMHX010000056.1	Запит № 1 Запит № 2	США	X-F
Scheffersomyces stambukii UFMG-CM-Y427	NBZC01000006.1 NBZC01000158.1	Запит № 1 Запит № 2	США	НВ
Scheffersomyces amazonensis CBS 12363	JARGRW010000001 JARGRW010000027	Запит № 1 Запит № 2	США	НВ
Scheffersomyces gosingicus CBS 11433	JAKVQZ010000085.1 JAKVQZ010000164.1	Запит № 1 Запит № 2	США	C-F
Scheffersomyces spartinae NRRL Y-7322 ^{TM}	JAKTUP010000011.1 JAKTUP010000165.1	Запит № 1 Запит № 2	США	Non-F
Scheffersomyces spartinae ARV_011	JAHMUF010000007.1 JAHMUF010000032.1	Запит № 1 Запит № 2	США, вода	Non-F

Примітка: ^{T} — типовий штам, ^{TM} — типовий матеріал, НВ — не визначено,* — підгрупи відповідно до їх здатності ферментувати ксилозу (X-F) та целобіозу (C-F) [17].

утилізує ані ксилозу, ані целобіозу (Non-F subclade). Наявність у вибірці штамів дріжджів *Scheffersomyces*, що належать до різних субклад, відображено на рис. 3.

Встановлено існування кореляції показників подібності послідовностей штамів до послідовності амплікона (запит № 1) та здатності утилізувати вуглеводи. Так, ці показники для штамів з X-F та C-F субклад значно вищі (Qc > 71 %), ніж для штамів ARV_011 та NRRL Y-7322 виду *Scheffersomyces spartinae* (табл. 2).

Проведено комп'ютеризований аналіз штамів роду *Scheffersomyces* з використанням як запитів послідовності дослідженого амплікона штаму *S. stipitis* UCM Y-2810 (запит № 1) та фрагмента його кластеру рибосомальних РНК (запит № 2). Результати проведених попарних вирівнювань представлено в табл. 2. Отримані результати показали зв'язок між значеннями показників подібності сиквенсів детермінант, що кодують протеази та фрагменти рибосомальних кластерів. Яскравим прикладом можуть слугувати результати BLASTN-аналізу послідовностей штамів видів *Scheffersomyces stipitis, Scheffersomyces shehatae* та *Scheffersomyces spartinae* (табл. 2).

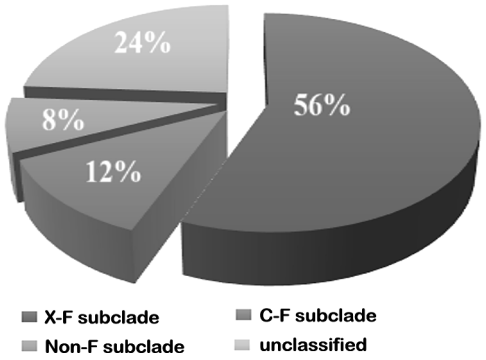

Рис. 3. Наявність штамів роду *Scheffersomyces* (%) у різних субкладах

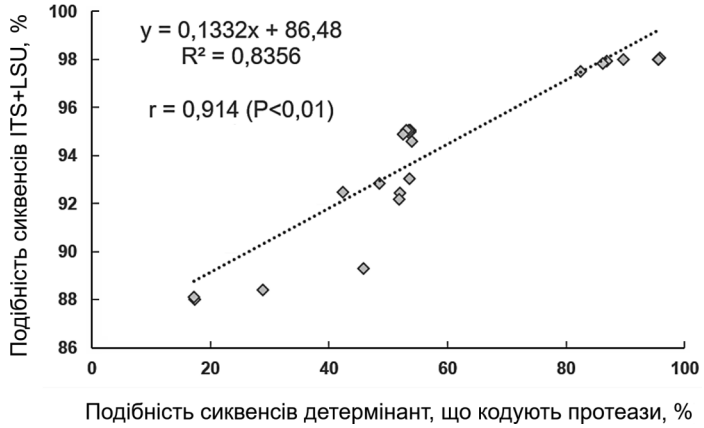

Рис. 4. Кореляційний аналіз зв'язку між значеннями показників подібності сиквенсів детермінант, що кодують вакуолярні протеази B та фрагменти рибосомальних кластерів, з урахуванням даних з покриття послідовностей. На графіку представлено рівняння лінійної регресії та коефіцієнт лінійної кореляції Пірсона (r)

ТАБЛИЦЯ 2. Показники подібності послідовностей вибірки штамів дріжджів із бази даних сиквенсам запитів, стосовно штаму Scheffersomyces stipitis UCM Y-2810

Штами досліджуваних дріжджів	Показники подібності сиквенсам запитів		Суб-клади*
	Запит № 1	Запит № 2	
Scheffersomyces stipitis CBS 6054	Qc=96 % I=99.82 %	Qc=100 % I=98.07 %	X-F
Scheffersomyces stipitis NRRL Y-7124	Qc=96 % I=99.63 %	Qc=100 % I=97.99 %	X-F
Scheffersomyces illinoinensis NRRL Y-48827	Qc=96 % I=93.43 %	Qc=100 % I=97.99 %	X-F
Scheffersomyces segobiensis DSM 27193	Qc=96 % I=90.46 %	Qc=100 % I=97.92 %	X-F
Scheffersomyces segobiensis NRRL Y-11571	Qc=96 % I=89.72 %	Qc=100 % I=97.83 %	X-F
Scheffersomyces titani CBS 13926	Qc=96 % I=85.84 %	Qc=100 % I=97.51 %	HB
Scheffersomyces insectosa NRRL Y-12854	Qc=73 % I=73.99 %	Qc=100 % I=94.58 %	X-F
Scheffersomyces virginianus NRRL Y-48822	Qc=73 % I=73.63 %	Qc=100 % I=95.04 %	X-F
Scheffersomyces shehatae NRRL Y-12858	Qc=73 % I=73.40 %	Qc=100 % I=95.04 %	X-F
Scheffersomyces shehatae NBRC1983	Qc=73 % I=73.40 %	Qc=100 % I=95.04 %	X-F
Scheffersomyces shehatae ATY839	Qc=73 % I=73.46 %	Qc=67 % I=93.04 %	X-F
Scheffersomyces parashehatae CBS 12535	Qc=73 % I=73.51 %	Qc=100 % I=94.98 %	HB
Scheffersomyces quercinus NRRL Y-48825	Qc=73 % I=73.16 %	Qc=100 % I=94.96 %	X-F
Scheffersomyces xylosifermentans CBS 12540	Qc=73 % I=73.22 %	Qc=100 % I=95.04 %	HB
Scheffersomyces cryptocercus NRRL Y-48824	Qc=73 % I=72.55 %	Qc=100 % I=95.04 %	HB
Scheffersomyces lignosus NRRL Y-12856	Qc=73 % I=71.97 %	Qc=100 % I=94.88 %	X-F
Scheffersomyces lignosus JCM 9837	Qc=73 % I=71.97 %	HB	X-F
Scheffersomyces coipomensis NRRL Y-17651	Qc=73 % I=71.12 %	Qc=100 % I=92.43 %	C-F
Candida broadrunensis CBS 11838	Qc=72 % I=67.40 %	Qc=100 % I=92.83 %	HB
Scheffersomyces ergatensis NRRL Y-17652	Qc=71 % I=73.04 %	Qc=100 % I=92 17 %	X-F
Scheffersomyces stambukii UFMG-CM-Y427	Qc=70 % I=65.52 %	Qc=100 % I=89.31 %	HB
Scheffersomyces amazonensis CBS 12363	Qc=61 % I=69.32 %	Qc=100 % I=92.48 %	HB
Scheffersomyces gosingicus CBS 11433	Qc=38 % I=76.02 %	Qc=100 % I=88.41 %	C-F
Scheffersomyces spartinae NRRL Y-7322	Qc=22 % I=78.91 %	Qc=100 % I=88.01 %	Non-F
Scheffersomyces spartinae ARV_011	Qc=22 % I=78.12 %	Qc=100 % I=88.09 %	Non-F

Примітка: I — ідентичність або подібність послідовностей (Identity); Qc — покриття (Query coverage); HB — не визначено; * — підгрупи відповідно до здатності ферментувати ксилозу та целобіозу (X-F), і целобіозу (C-F), або нездатності ферментувати ці цукри (Non-F); запит № 1 — досліджуваний амплікон гена вакуолярної серинової протеази; запит № 2 — сумарна послідовність ITS+LSU.

Для послідовностей, виявлених для 24-х дріжджових штамів, представлених в табл. 2, проведено кореляційний аналіз зв'язку між значеннями показників подібності сиквенсів детермінант, що коду-

ють ген вакуолярної серинової протеази та фрагменти рибосомальних кластерів (ITS+LSU) (рис. 4).

Обчислення значень ідентичності проводилися з урахуванням відповідного показника покриття послідовностей для кожного штаму. У підсумку була встановлена статистично вірогідна сильна позитивна кореляція між значеннями показників подібності сиквенсів для детермінант, що кодують протеази та тих, які кодують фрагменти рибосомальних кластерів.

Така кореляція може свідчити про філогенетичну перспективність використання послідовності гена вакуолярної серинової протеази в ідентифікації дріжджів роду *Scheffersomyces* і тісно споріднених мікроорганізмів.

Таким чином, послідовності, подібні амплікону *Scheffersomyces stipitis* UCM Y-2810, виявлені в геномах грибів з підвідділу Saccharomycotina. Відібрані послідовності були фрагментами генів, що детермінують вакуолярні протеїнази B. Встановлено існування сильної позитивної кореляції між значеннями показників подібності сиквенсів детермінант штамів видів *Scheffersomyces*, які кодують вакуолярні протеази B та фрагменти рибосомальних кластерів (ITS+LSU).

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Ji Won Hong from Kyungpook National University, Daegu, South Korea for his invaluable help with sequencing fragments of chromosomal DNA of yeast strain.

REFERENCES

1. Peay, K.G., Kennedy, P.G. & Bruns, T.D. (2008). Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. Biosci., 58 (9), pp. 799-810. https://doi.org/10.1641/b580907
2. Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium & Fungal Barcoding Consortium Author List (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proceed. Nat. Acad. Sci. USA, 109 (16), pp. 6241-6246. https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109
3. Bruns, T.D., White, T.J. & Taylor, J.W. (1991). Fungal Molecular Systematics. Ann. Rev. Ecol., Evolut., Systemat., 22, pp. 525-564. https://doi.org/10.1146/annurev.es.22.110191.002521
4. Yamada, Y., Maeda, K. & Mikata, K. (1994). The phylogenetic relationships of the hat-shaped ascospore-forming, nitrate-assimilating Pichia species, formerly classified in the genus Hansenula Sydow et Sydow, based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs (Saccharomycetaceae): the proposals of three new genera, Ogataea, Kuraishia, and Nakazawaea. Biosci., Biotechnol., Biochem., 58 (7), pp. 1245-1257. https://doi.org/10.1271/bbb.58.1245
5. Ueda-Nishimura, K. & Mikata, K. (2001). Reclassification of Pichia scaptomyzae and Pichia galeiformis. Antonie van Leeuwenh., 79 (3-4), pp. 371-375. https://doi.org/10.1023/a:1012045906098
6. Větrovský, T., Kolařík, M., Žifčáková, L., Zelenka, T. & Baldrian, P. (2016). The rpb2 gene represents a viable alternative molecular marker for the analysis of environmental fungal communities. Mol. Ecol. Res., 16 (2), pp. 388-401. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12456
7. Xu, J. (2016). Fungal DNA barcoding. Genome, 59 (11), pp. 913-932. https://doi.org/10.1139/gen-2016-0046

8. Pérez-Izquierdo, L., Morin, E., Maurice, J.P., Martin, F., Rincón, A. & Buée, M. (2017). A new promising phylogenetic marker to study the diversity of fungal communities: the glycoside hydrolase 63 gene. Mol. Ecol. Res., 17 (6), e1-e11. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12678
9. Meyer, W., Irinyi, L., Hoang, M.T.V., Robert, V., Garcia-Hermoso, D., Desnos-Ollivier, M., Yurayart, C., Tsang, C.C., Lee, C.Y., Woo, P.C.Y., Pchelin, I.M., Uhrlab, S., Nenoff, P., Chindamporn, A., Chen, S., Hebert, P.D.N., Sorrell, T. C. & ISHAM barcoding of pathogenic fungi working group (2019). Database establishment for the secondary fungal DNA barcode translational elongation factor 1α (TEF1α) [1]. Genome, 62 (3), pp. 160-169. https://doi.org/10.1139/gen-2018-0083
10. Moehle, C.M., Tizard, R., Lemmon, S.K., Smart, J. & Jones, E.W. (1987). Protease B of the lysosomelike vacuole of the yeast Saccharomyces cerevisiae is homologous to the subtilisin family of serine proteases. Mol. Cell. Biol., 7 (12), pp. 4390-4399. https://doi.org/10.1128/mcb.7.12.4390-4399.1987
11. Hecht, K.A., O'Donnell, A.F. & Brodsky, J.L. (2014). The proteolytic landscape of the yeast vacuole. Cellular Logistics, 4 (1), e28023. https://doi.org/10.4161/cl.28023
12. Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L. & Ballabio, A. (2013). Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. Nature Rev. Mol. Cell Biol., 14 (5), pp. 283-296. https://doi.org/10.1038/nrm3565
13. Ianieva, O.D. (2022). Pentose-fermenting yeasts in nature: ecology, biodiversity, and applications. Mikrobiol. zhurn., 84 (5), pp. 58-71. https://doi.org/10.15407/microbiolj84.05.058
14. Ianieva, O.D., Fomina, M.O., Babich, T.V., Dudka, G.P. & Pidgorskyi, V.S. (2022). Evaluation of non-conventional yeasts isolated from rotten wood for hydrolytic activities and xylose fermentation. Mikrobiol. zhurn., 84 (4), pp. 88-97. https://doi.org/10.15407/microbiolj84.04.088
15. Fomina, M., Yurieva O., Pavlychenko, A., Syrchin, S., Filipishena, O., Polishchuk, L., Hong, J.W., Hretskyi, I., Ianieva, O. & Pidgorskyi, V. (2024). Application of natural fungi in bioconversion of lignocellulosic waste to second-generation ethanol. Biosyst. Divers., 32 (1), pp. 49-59. https://doi.org/10.15421/012405
16. Reeb, V., Lutzoni, F. & Roux, C. (2004). Contribution of RPB2 to multilocus phylogenetic studies of the euascomycetes (Pezizomycotina, Fungi) with special emphasis on the lichen-forming Acarosporaceae and evolution of polyspory. Mol. Phylogen. Evolut., 32 (3), pp. 1036-1060. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.04.012
17. Urbina, H. & Blackwell, M. (2012). Multilocus phylogenetic study of the Scheffersomyces yeast clade and characterization of the N-terminal region of xylose reductase gene. PloS One, 7 (6), e39128. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039128
18. Morais, C.G., Cadete, R.M., Uetanabaro, A.P., Rosa, L.H., Lachance, M.A. & Rosa, C.A. (2013). D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. Fungal Gen. Biol., 60, pp. 19-28. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.07.003
19. Araújo, J.A., de Abreu-Lima, T.L. & Carreiro, S.C. (2019). Selection and identification of xylose-fermenting yeast strains for ethanol production from lignocellulosic biomass. Boletim Do Centro De Pesquisa De Processamento De Alimentos, 36 (1), pp. 68-79. https://doi.org/10.5380/bceppa.v36i1.59557

Received 01.04.2024

BIOINFORMATIC STUDY OF VACUOLAR PROTEASES B SEQUENCES IN *SCHEFFERSOMYCES STIPITIS* YEAST

L.V. Polishchuk, M.O. Fomina

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine
154 Akademika Zabolotnogo St., Kyiv, 03143, Ukraine

The aim of work was to study the genomes of representatives of the kingdom Fungi for the prevalence of sequences that are similar to the amplicon sequence of the xylose-fermenting

yeast strain *Scheffersomyces stipitis* UCM Y-2810 and to determine the level of their genetic relation. The yeast strain *Scheffersomyces stipitis* UCM Y-2810 was isolated in 2021 from decaying wood. An amplicon (567 bp) of the genomic sequence of the isolate was obtained. In bioinformatic research, GenBank «Nucleotide collection» database and the BLASTN program package on the NCBI server were used, and only the sequences of chromosomes of organisms whose nucleotide sequence was fully determined were analyzed. Sequences similar to obtained amplicon were found to belong to fungi from the *Saccharomycotina subphylum* (*Ascomycota phylum*). The selected sequences turned out to be exclusively fragments of genes that determine vacuolar proteinases B. In the genome of each fungal organism from the obtained sample data, there was just one sequence similar to the studied amplicon. Genus *Scheffersomyces* strains showed the highest similarity values. The molecular size of the *Scheffersomyces stipitis* UCM Y-2810 amplicon was found to be 67.2 % of the size of the determinant sequence encoding the enzyme domain of *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 from the Dutch WI-KNAW collection of microorganisms. For the genus *Scheffersomyces* strains, a statistically reliable strong positive correlation was established between the similarity values of the determinant sequences encoding vacuolar proteases B and fragments of ribosomal clusters (ITS+LSU). Sequences similar to *Scheffersomyces stipitis* UCM Y-2810 amplicon belonged exclusively to the yeasts of subphylum Saccharomycotina, where the determinants encoding vacuolar proteases B of *Scheffersomyces* strains were the most similar ones. Given the correlation with ribosomal barcodes for fungi, the sequence of the vacuolar serine protease gene can be considered as an auxiliary genetic marker for the identification of yeasts of genus *Scheffersomyces*.

Key words: Scheffersomyces, amplicon, vacuolar serine protease, gene, identity, query coverage.

ORCID

Л.В. ПОЛІЩУК — L.V. Polishchuk https://orcid.org/0000-0002-3159-5022

М.О. ФОМІНА — M.O. Fomina https://orcid.org/0000-0001-5437-7688