

Анализ на биоразнообразието на дрожди от различни
екосистеми -резултати от първия български ДНК
баркодинг проект

Дилнора Гулямова

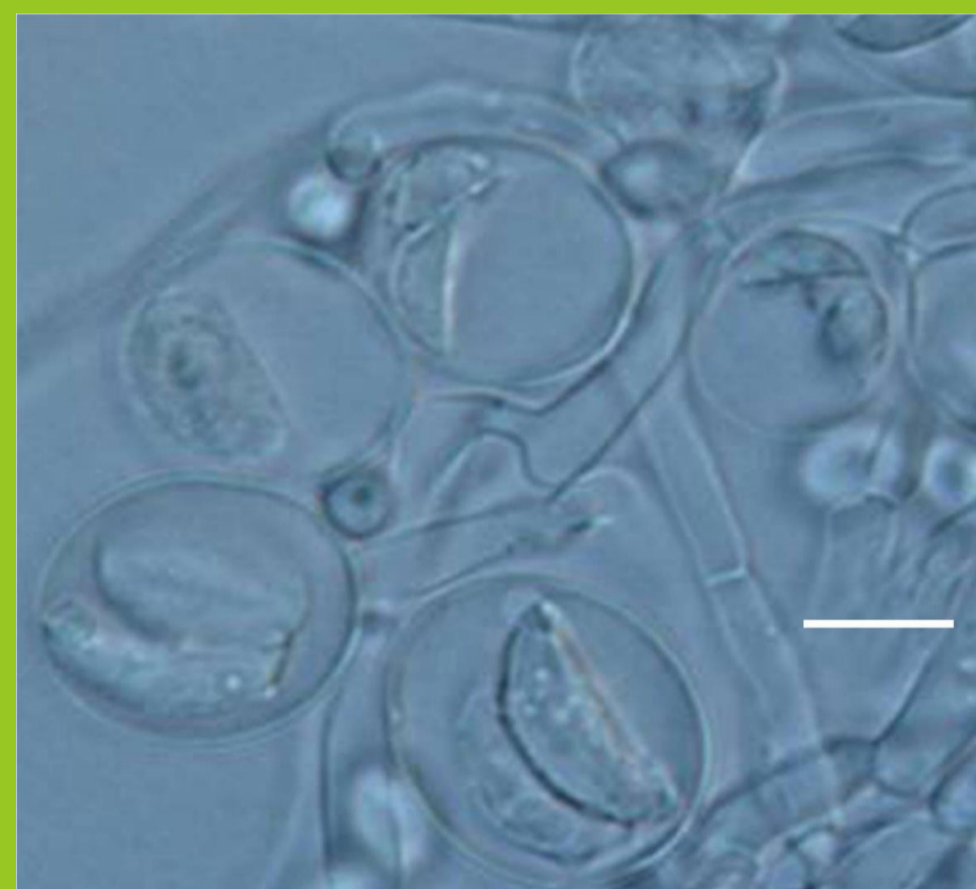
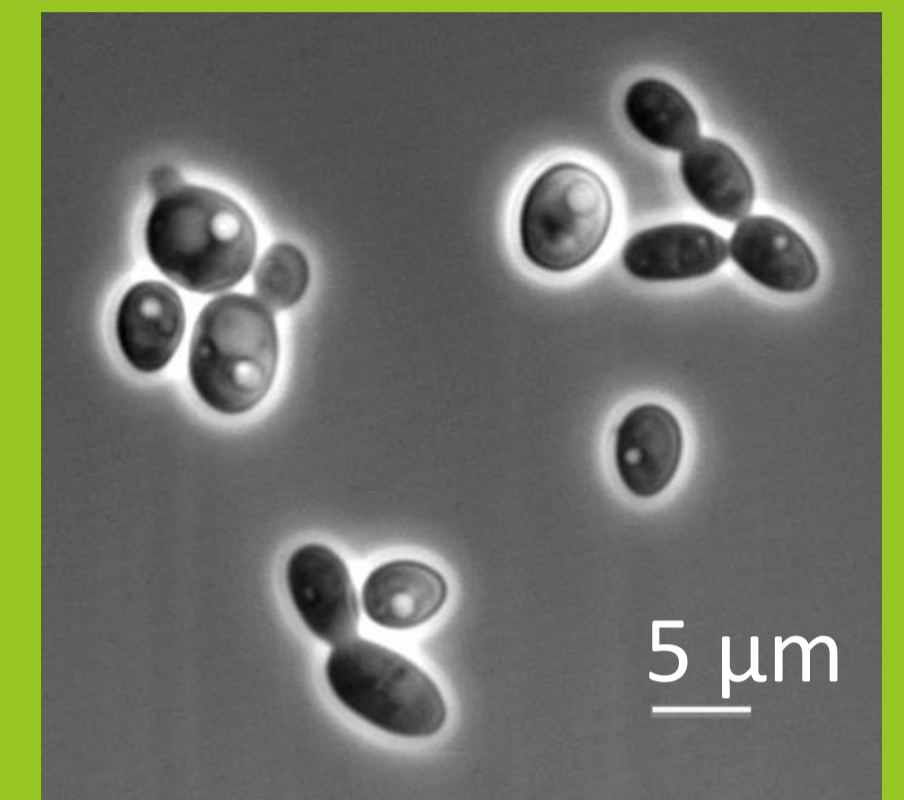
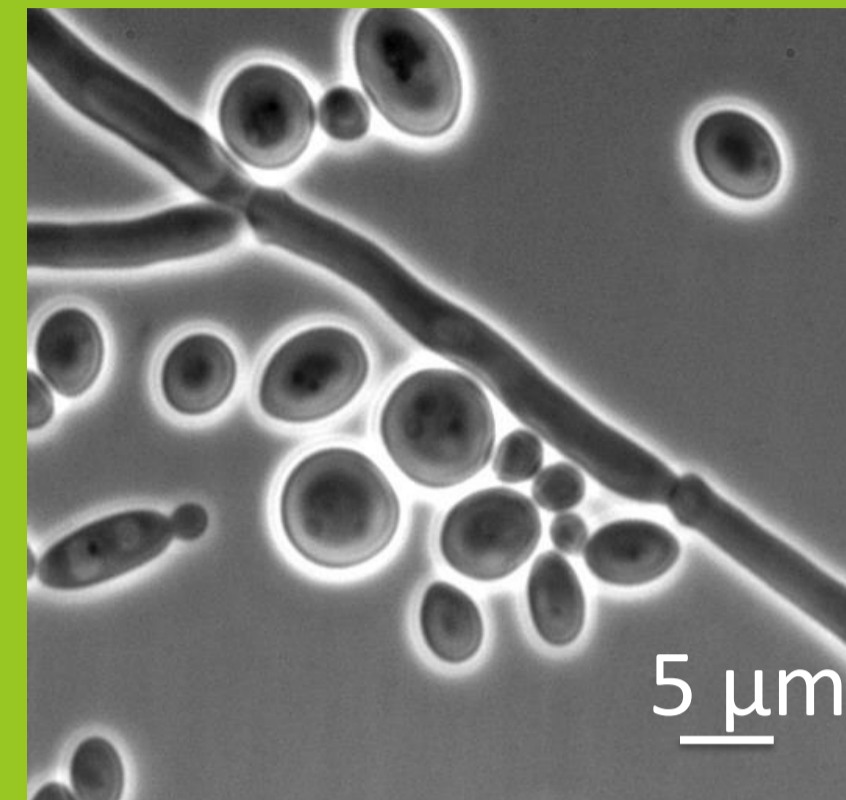
Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“, БАН



До 1960 г. основните методи за идентификация на дрожди бяха базирани на анализи на морфологични и биохимични маркери.

Морфологични маркери:

форма и големина на клетки,
способ на пъпкуване,
образуване на истински хифи или псевдохифи
морфология на аскоспори



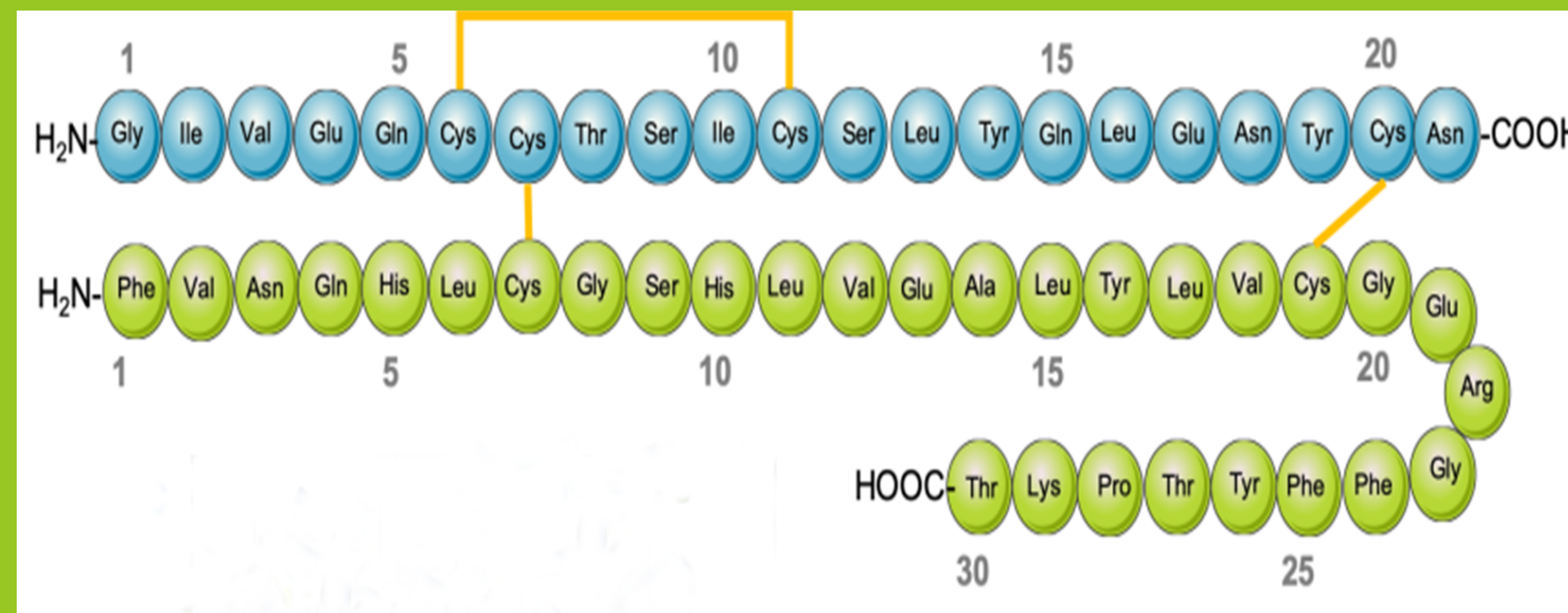
Фиг. 1. Морфологични маркери на дрожди

Биохимични маркери:

асимилиране на захари и източници на азот и други.

Общо ~ 100 маркера – тяхна разделителна способност е много низка поради огромно биоразнообразие на дрожди

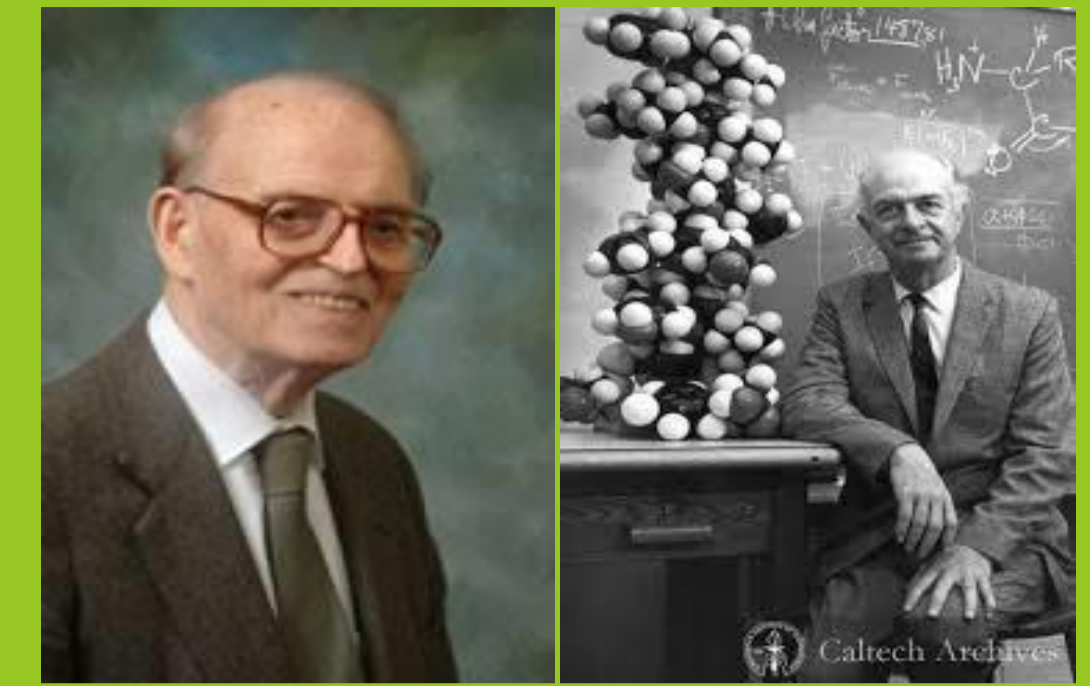
Молекулярни маркери



Фиг. 2 Първична последователност на инсулин

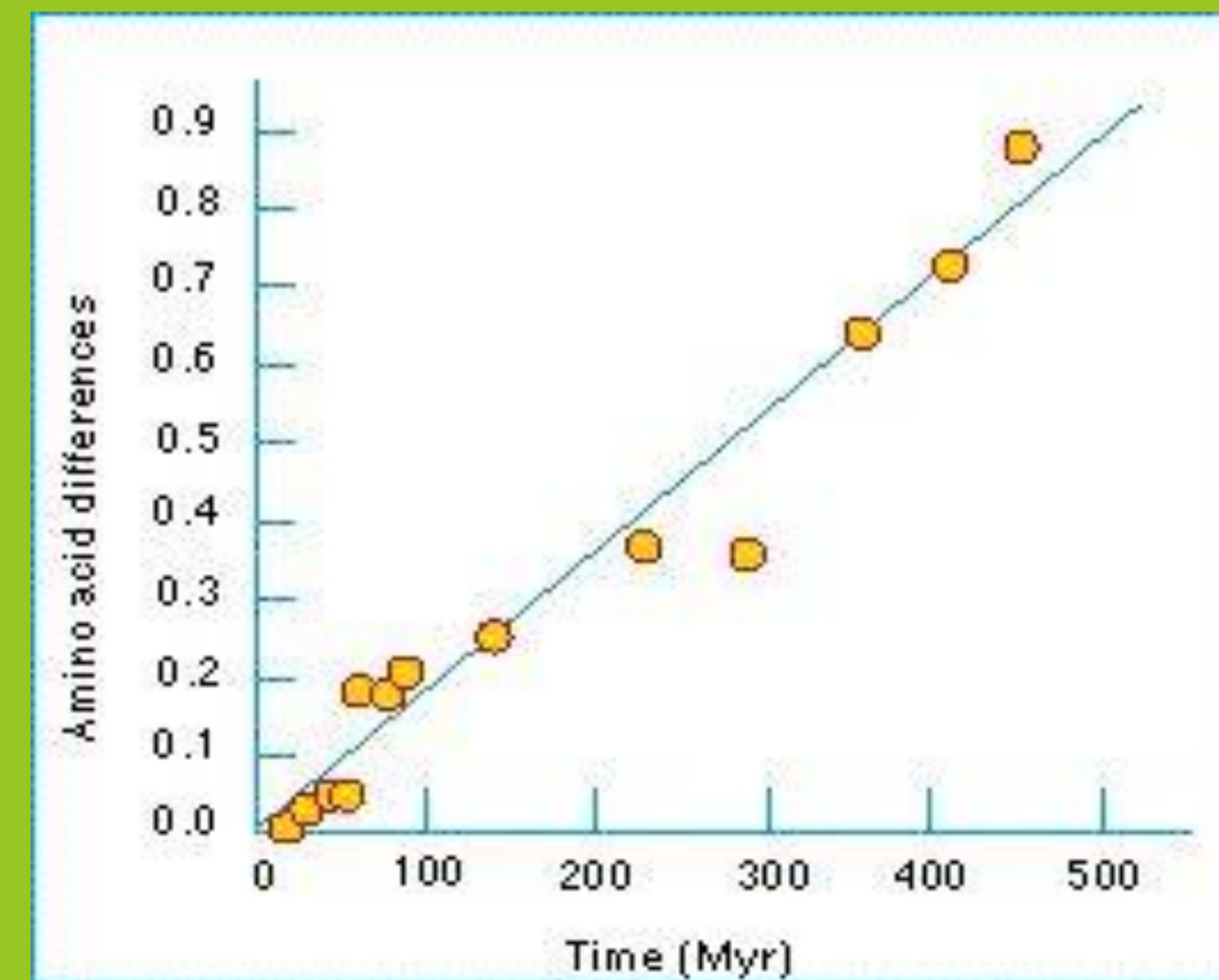
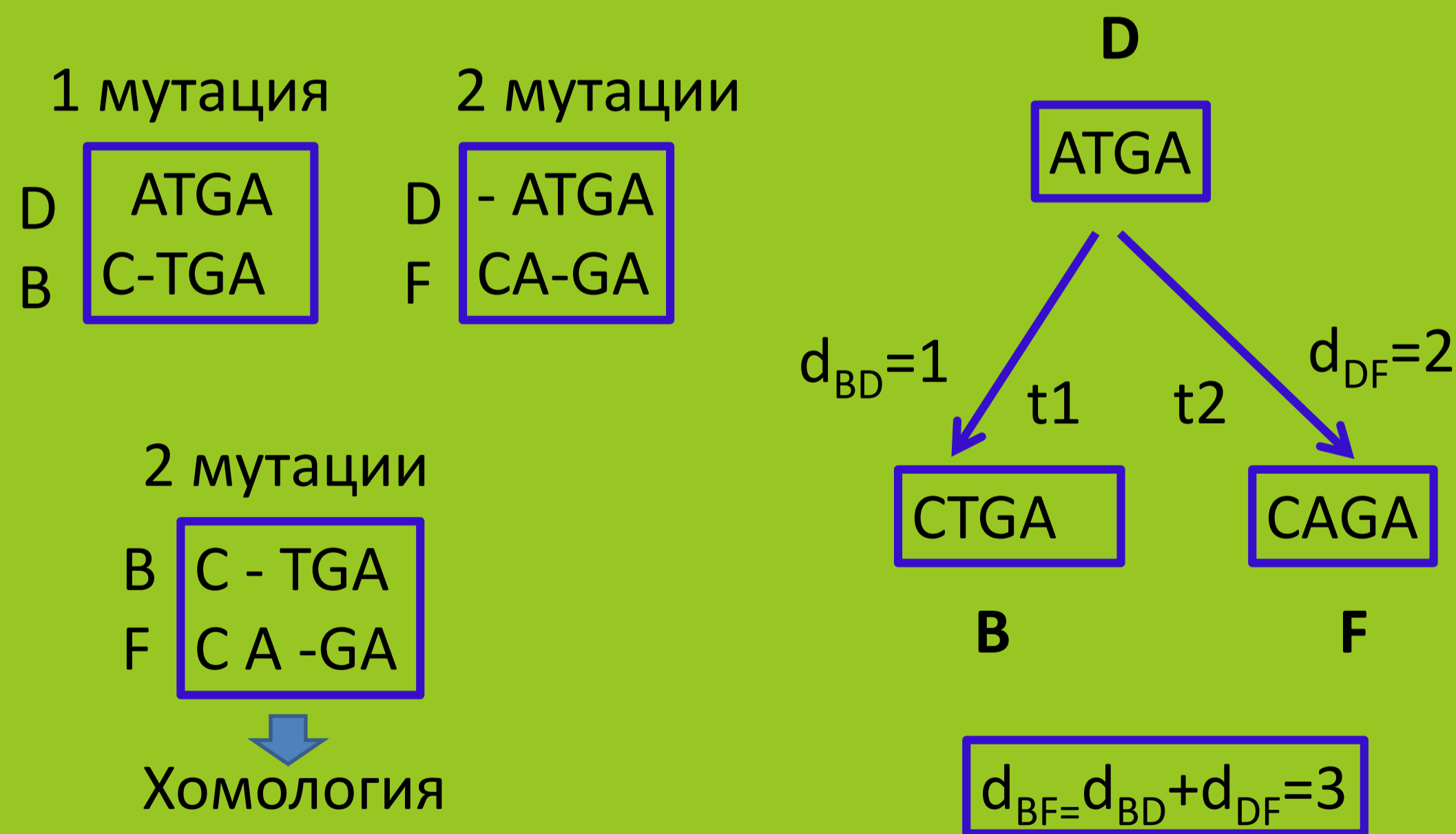
Ф. Сенгер (1951 г.) определи пълната аминокиселинна последователност на инсулин. Всеки белтък има уникална аминокиселинна последователност. На всяка позиция може да има 20 различни аминокиселини. Число на белтъчни признаци за сравняване - 20^N (20 а.к., N - дължина на белтъка)

Молекулярния часовник



1962 г. Е. Зукеркандл и Л. Полинг въвеждат понятието молекулярен часовник измервайки скоростта на мутациите в хемоглобини от близкородствени видове.

$$\text{Броя на мутации} = v_{\text{скорост}} \times t_{\text{време}}$$



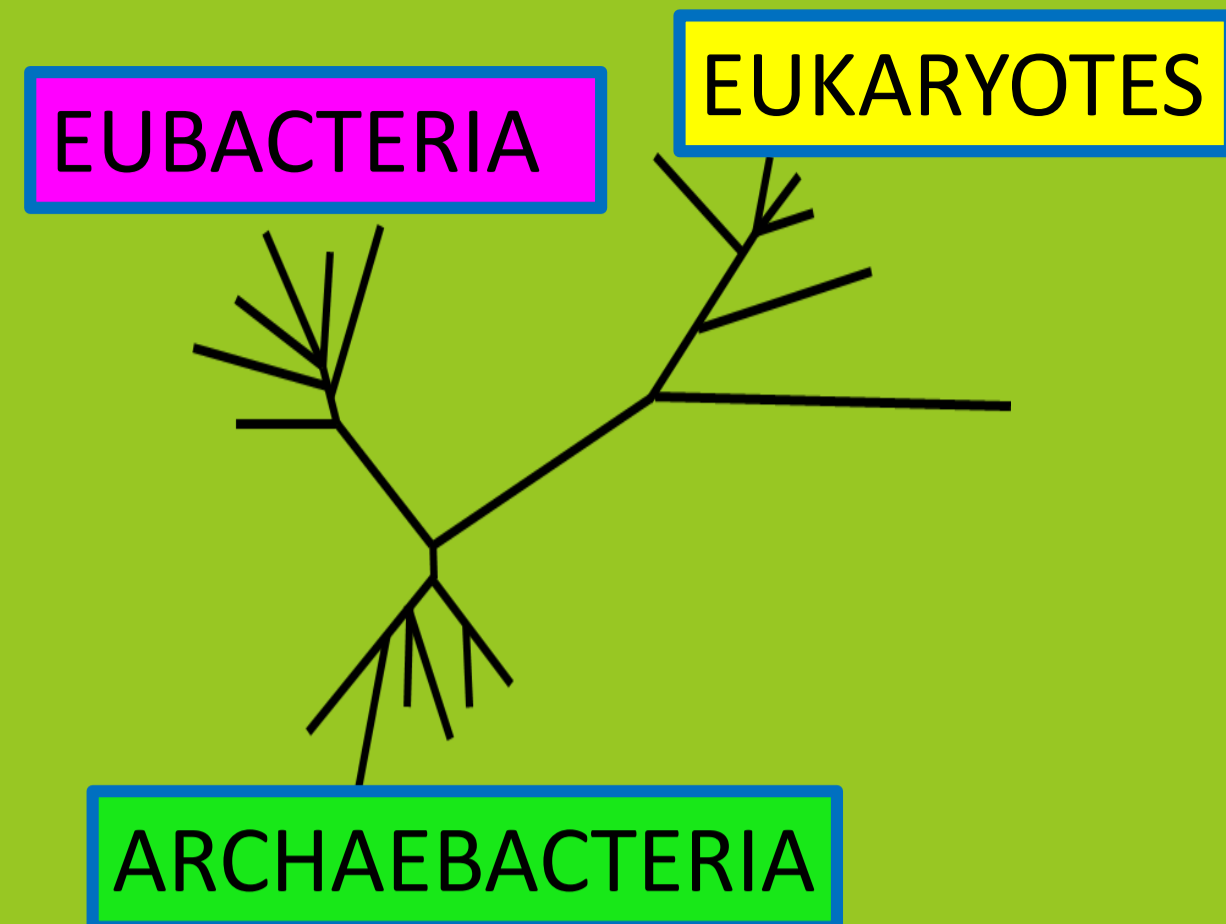
Фиг. 3. Зависимост на броя на мутации от времето на дивергенция.

Фиг. 4. Пример за изчисляване на еволюционното разстояние

Става възможно построяване на филогенетични дървета за произволни групи от видове.



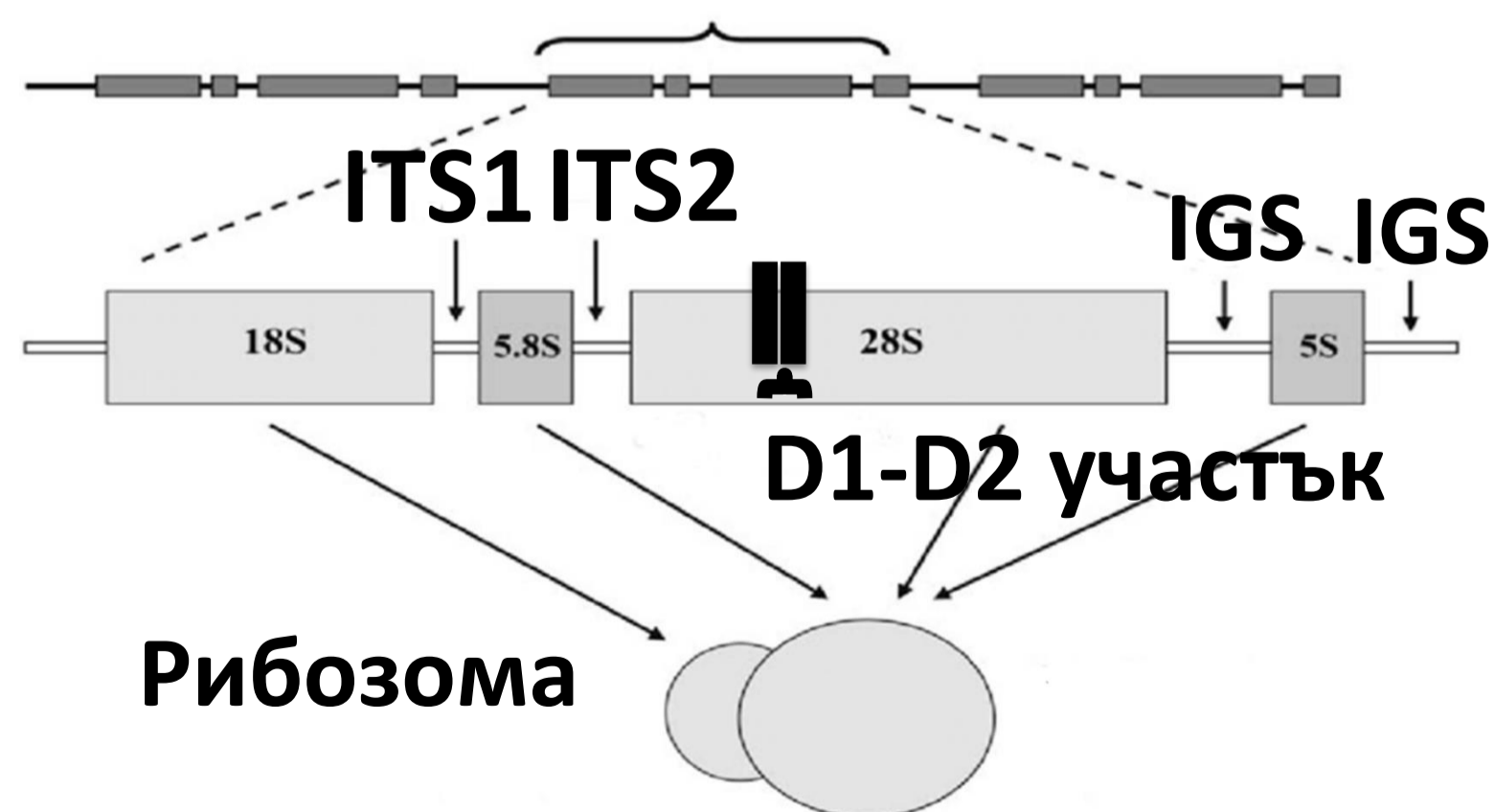
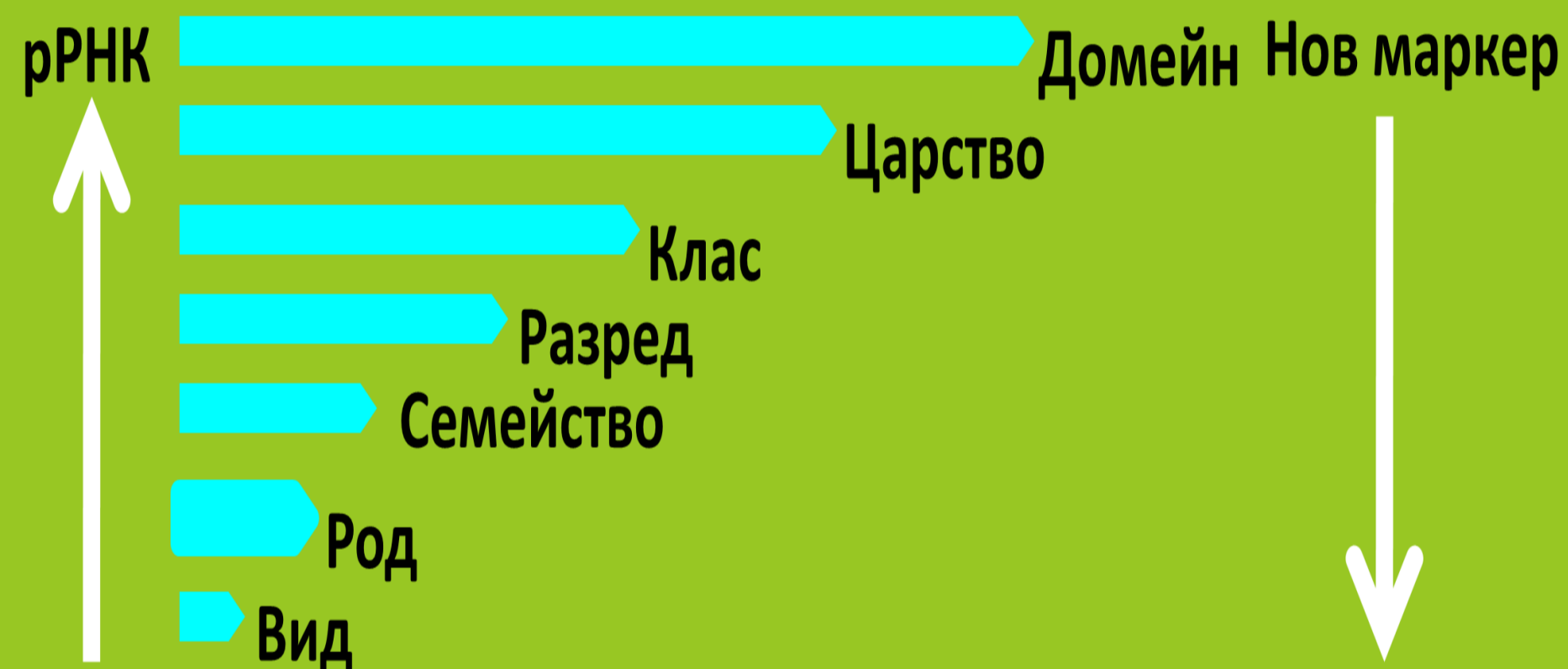
1977 - Карл Воуз направи революция в биология. Предложи използването на рРНК като универсален баркодиращ маркер за идентификация на организмите и определяне на генетично родство между тях.



Фиг. 5. Дърво на живота.

рРНК е перфектен еволюционен хронометър:

- ✓ универсална
- ✓ по стабилна от ДНК при изолиране
- ✓ консервативна
- ✓ рРНК лесно могат да бъдат подредени
- ✓ Число на признаци на рРНК - 4^{1600} (4 нуклеотида в степента на дължина на 18S рРНК)



Фиг. 6. Схематично изображение на дрождев рибозомален оперон.

✓ **Проблеми с ITS**

1. Трудно да се направи множествено подреждане на ITS секвенции без да се вземе предвид вторичната му структура.
2. Задачата за едновременно множествено подреждане на първичната и вторичната структури на макромолекули беше формулирана през 80 г. на 20 век от Д. Санкоф.
3. Решение на този проблем беше намерено от д-р Румен Димитров. Това ни даде възможност да получим изключително важни резултати.

Дрождите играят важна роля :

Екология - участват рециклирането и минерализацията на органични вещества

Индустрия - широко използвани в фармацевтична и хранително-вкусовата промишленности.

Медицина - някои от дрожди са опортюнистични патогени

България е сред държавите с най-голямо биологично разнообразие в Европа. Националните паркове Пирин, Рила и Витоша са сред най-големите и добре запазени природни територии. В Българските национални паркове се срещат ендемични растения, насекоми и бозайници. Всички тези екосистеми могат да бъдат източници на нови видове дрожди с важни биотехнологични характеристики.

Биоразнообразие на дрожди
от избрани
Български екосистеми ТК-176-
2008-2012
Финансиран от ФНИ.

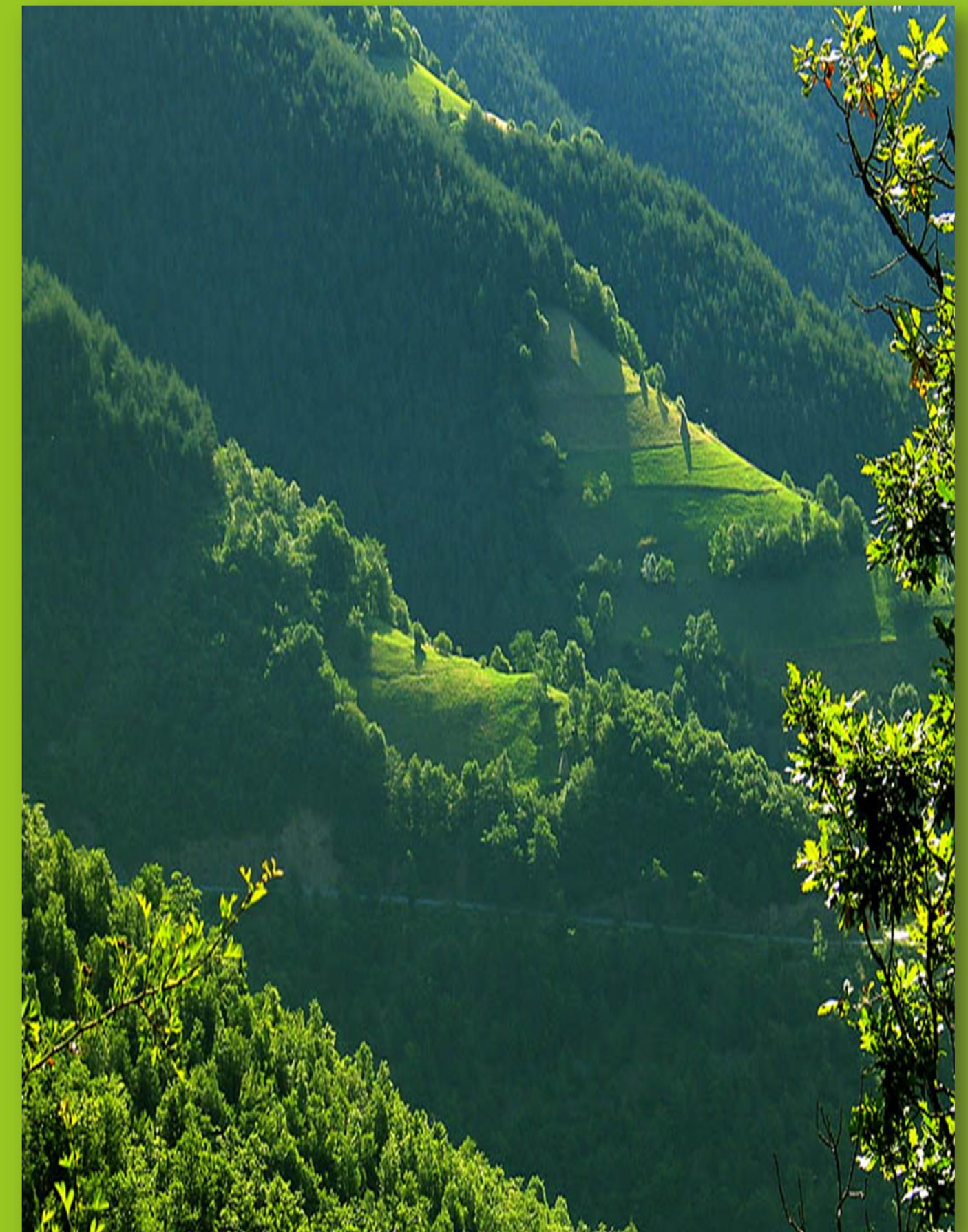
Рила



Пирин



Витоша



Методика

1. Изолиране на дрожди от биологически проби



1. Дезинфекция с 70% етанол



2. Стерилно отпрепарирание на чревния тракт

3. Хомогенизиране в 0.7% физиологичен разтвор

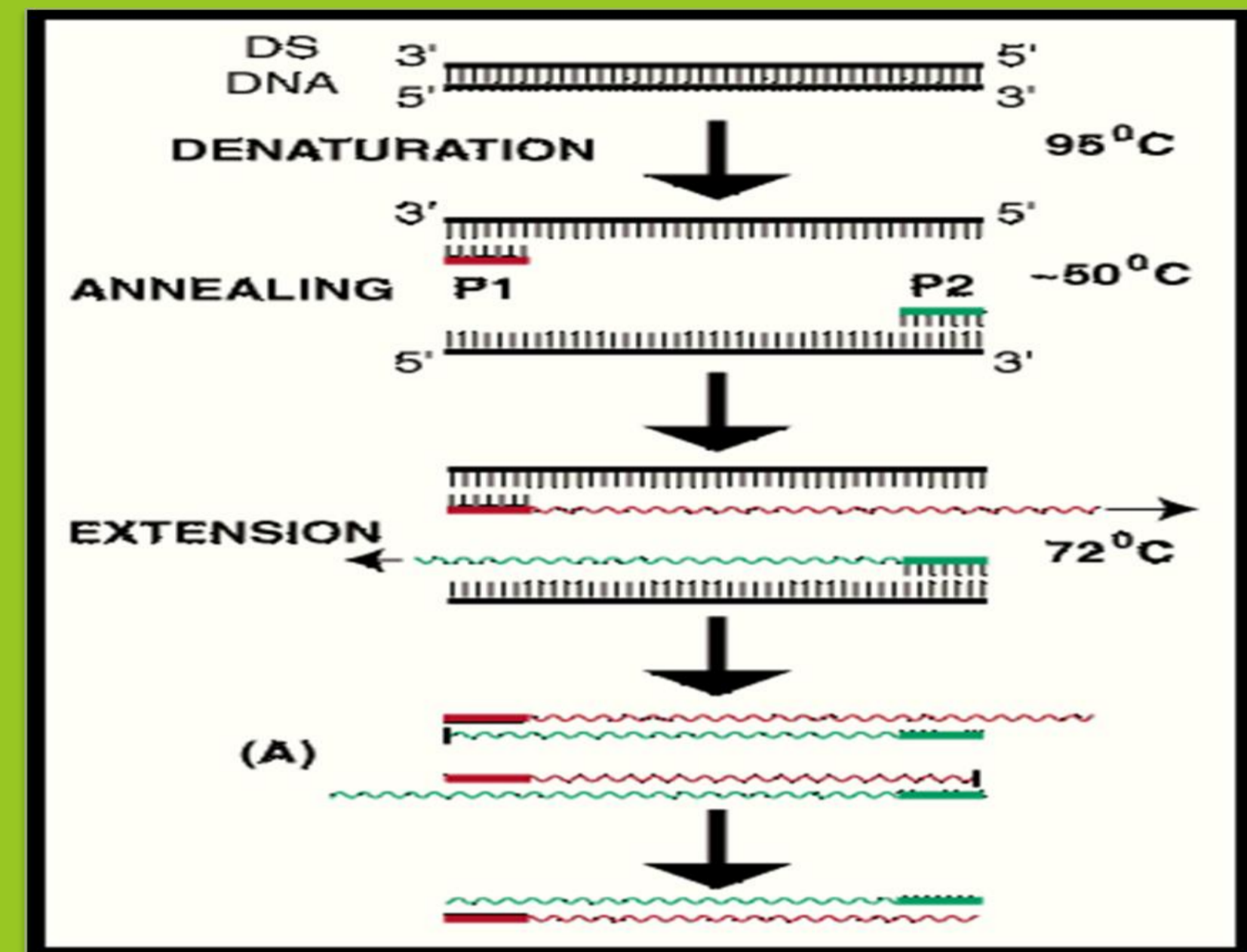


4. Посяване на среда УМ (рН-3.0-3.4)

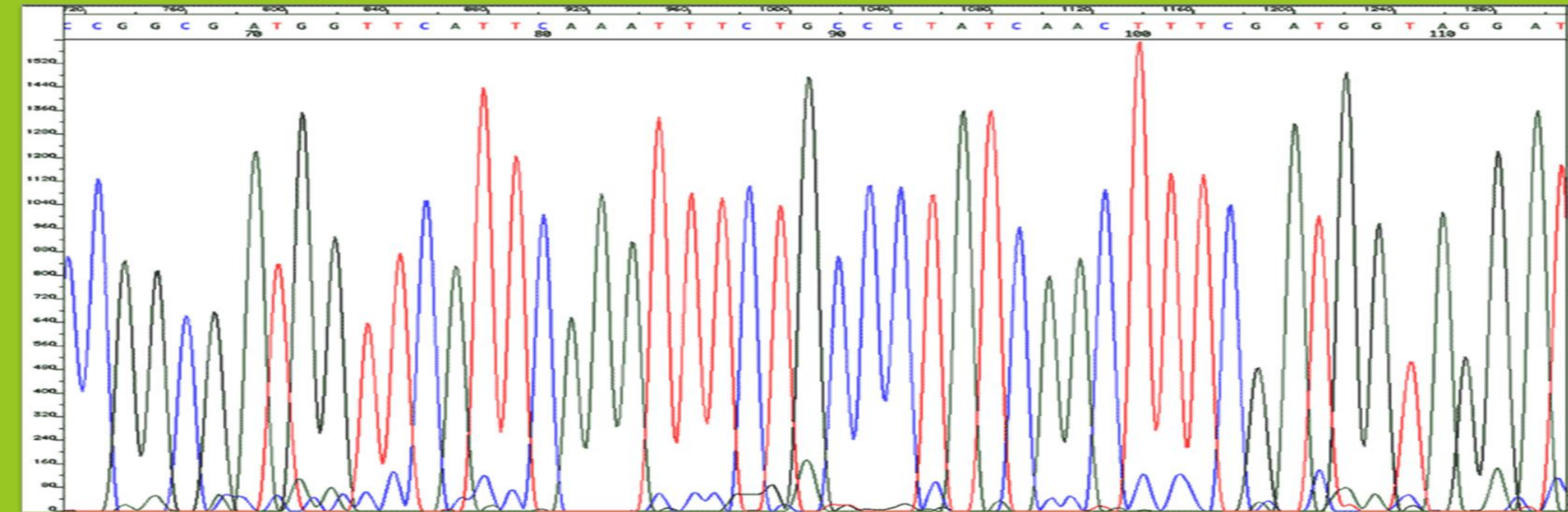
Проби от животни и хора



2. Изолиране на ДНК и намножаване на маркерни гени чрез PCR



3. Секвениране на PCR продукти с ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Macrogen, NL)



4. Сравняване на получените секвенции с тези от база данни GenBank – Blast анализ

Днес са секвенирани ITS и 26S рРНК гени на всички типови щамове на известни видове дрожди.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

5. Филогенетичен анализ Програми със свободен достъп: Mega v. 7

Метод за получаване на филогенетичното дърво

1. Множествено подреждане


Оригинална
секвенция

Бутстрап
секвенция

<i>S. cerevisiae</i>	A T G A C C	G T A A C A
<i>Y. lipolitica</i>	A T A A C T	A T A A C A
<i>N. valgi</i>	A T A A C T	A T A A C A
<i>S. panamericana</i>	A T G A C T	G T A A C A

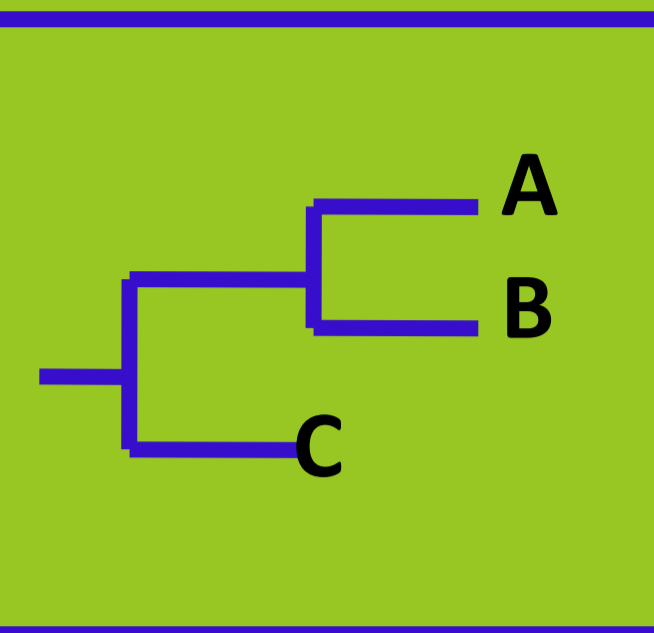
Колоната 3 се слага на място на 1-ва колона
След нея слагат случайно избрани колони
2, 1, 1, 5, 4

0123456789

A 
B 
C 

Neighbour-joining
Maximum-likelihood
Maximum parsimony

Алгоритм





1 Реплика

3173466762

A 
B 
C 




2 Реплика

52349224418

A 
B 
C 

3 Реплика

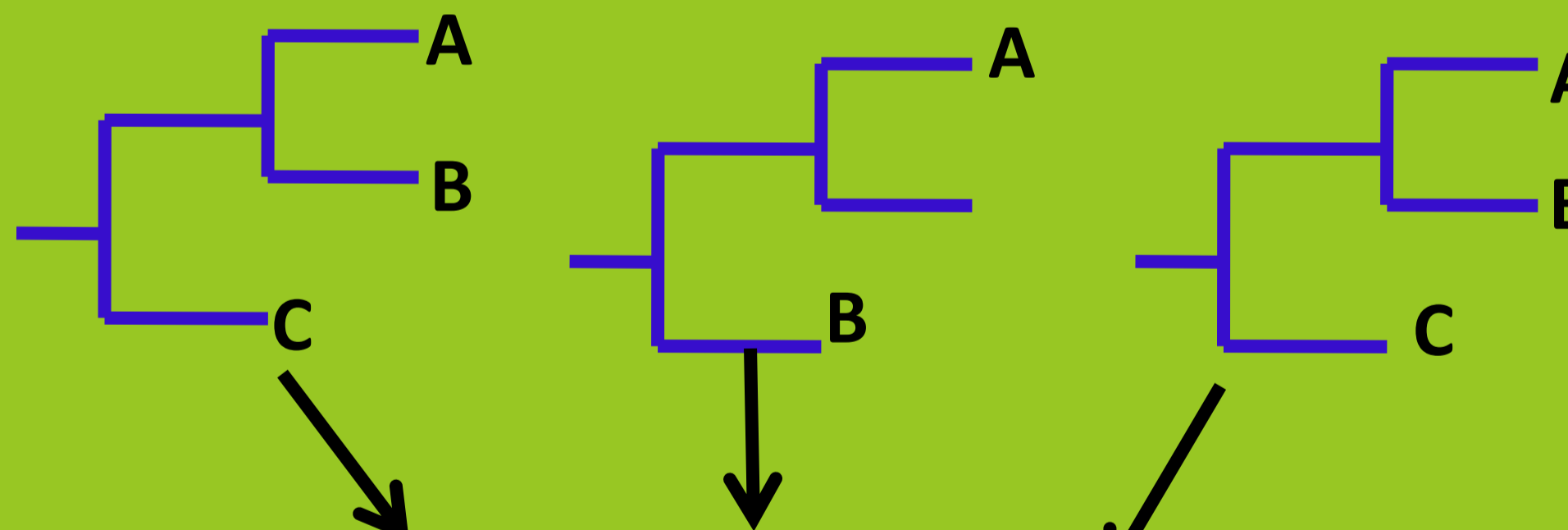
5607718907

A 
B 
C 

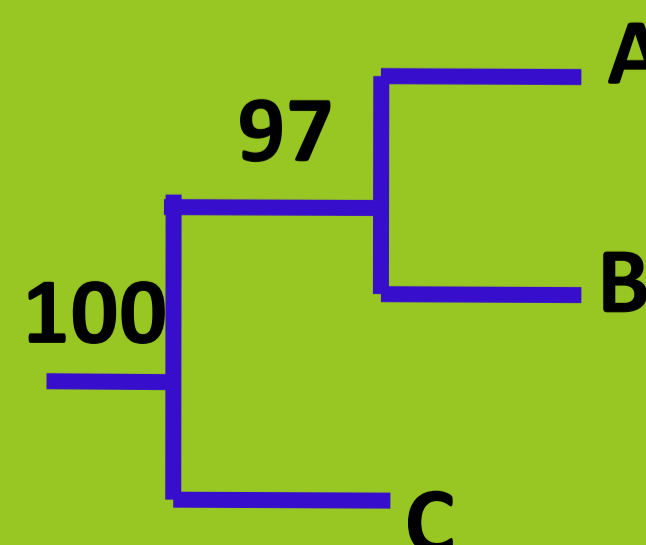
2. Генериране на
дървета при случайно
разместване на колони

3. Построяване на
дървета

4. Определя се какъв %
на топологиите поддържа
отделен клон



Консенсусно
дърво



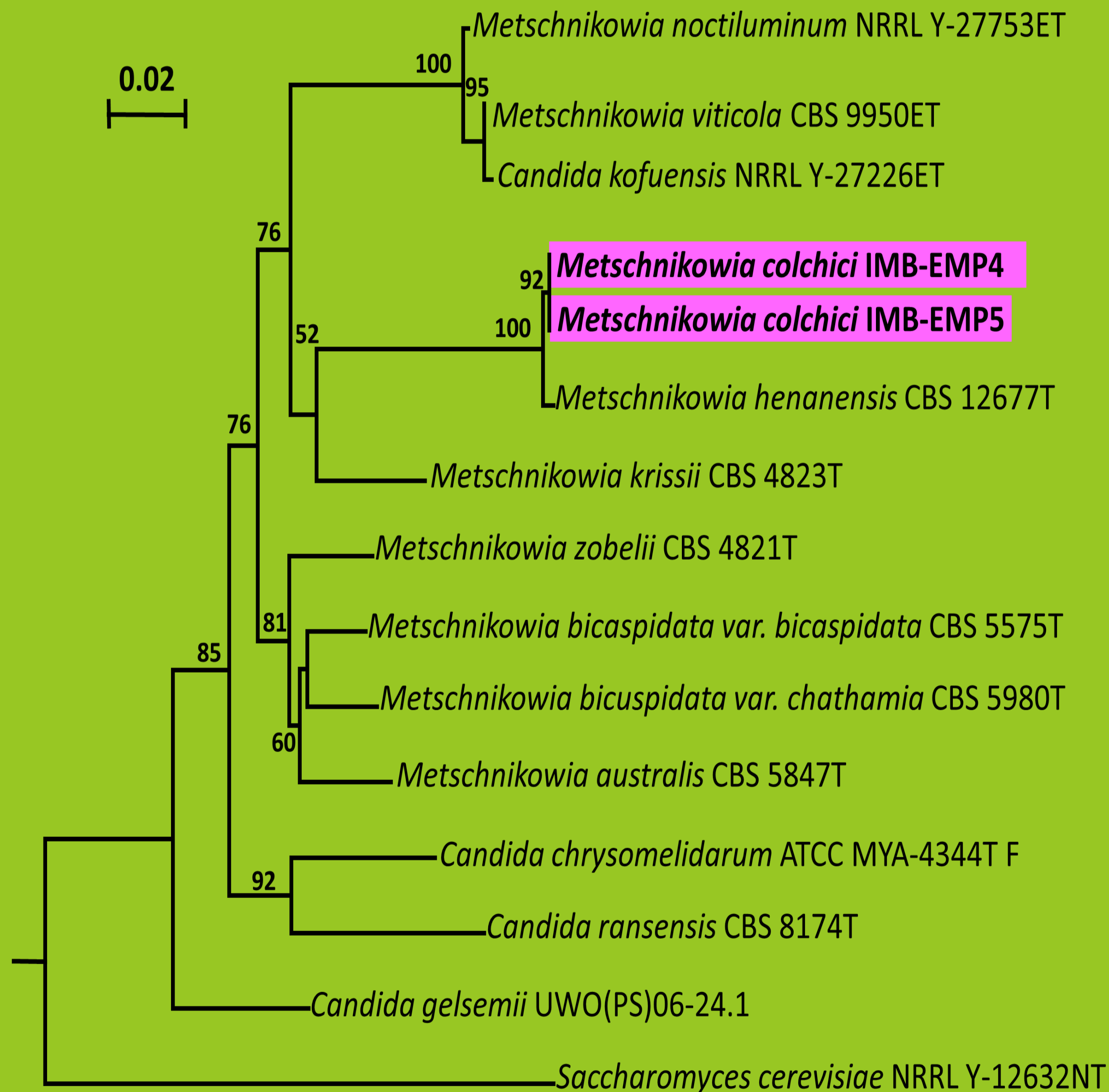
I. Дрожди асоциирани със цъфтящи растения.

Над 50 дрождеви щама бяха изолирани от цветя на различни растения събрани от Природен Парк Витоша, през април-август, 2009 г



Таблица 1. Дрождеви щамове изолирани от растения.

Щам	Най близък вид от Генбанк	% на сходство 26S рРНК/ITS
IMB17	<i>Candida boleticola</i>	100%
IMB18	<i>Candida magnifica</i>	100%
IMB20	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	100%
IMB49	<i>Candida shehatae</i>	100%
IMB50	<i>Candida riidocensis</i>	98.7%
IMB51	<i>Cryptococcus friedmannii</i>	100%
IMB54	<i>Clavispora lusitaniae</i>	99%
IMBEMP4	<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	88%
IMBEMP5	<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	88%
IMBR4_1	<i>Auriculibuller fuscus</i>	99%
IMBESM	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99%
IMBR1	<i>Lachancea thermotolerans</i>	100%
IMBR54	<i>Rhodospodium babjevae</i>	100%
IMBH1C	<i>Candida bombi</i>	99%
IMB22C	<i>Metschnikowia sinensis</i>	99%
IMB23C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100%
IMB24C	<i>Pichia fermentans</i>	99%
IMB36C	<i>Debaryomyces castellii</i>	99%
IMB40C	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	99%
IMB53C	<i>Pichia kudriavzevii</i>	100%
IMB57C	<i>Metschnikowia pulcherima</i>	99%
IMB67C	<i>Metschnikowia sinensis</i>	100%
IMB68C	<i>Pichia guilliermondii</i>	100%
IMB76C	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	100%



Фиг. 7. Филогенетично дърво получено чрез използване на комбиниран анализ на секвенциина 26S рРНК и ITS участъци

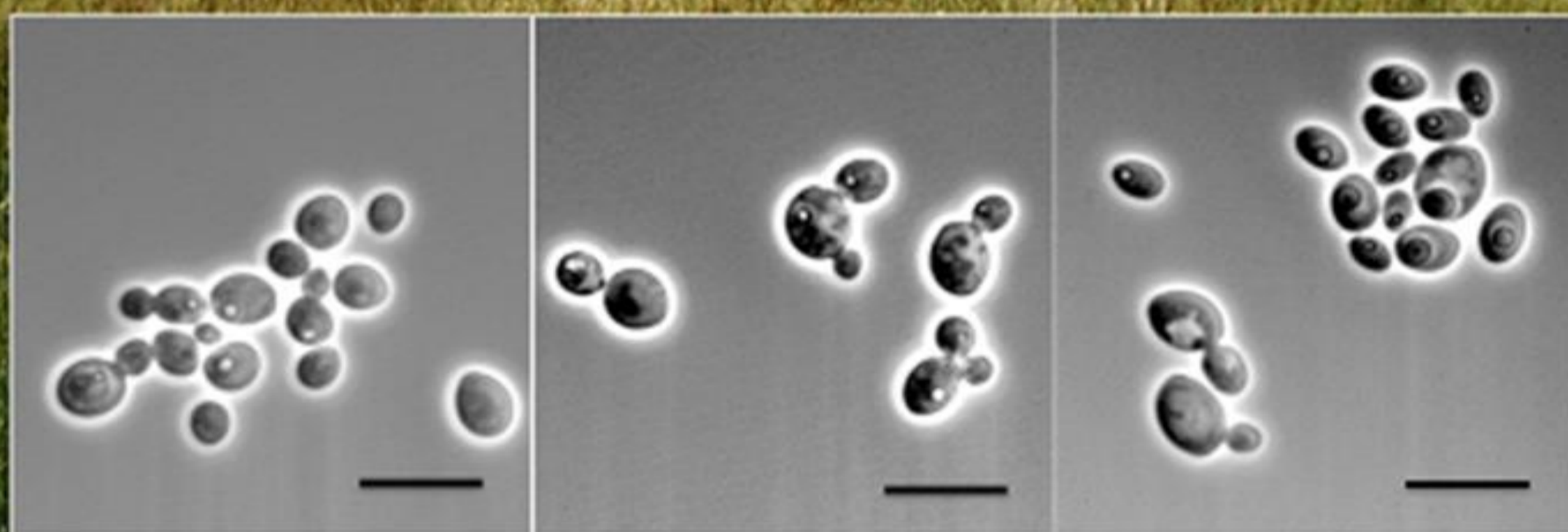


Metschnikowia colchici

Обикновеният мразовец
Colchicum autumnale,
Colchicaceae

Село Железница,
Природен парк Витоша.

Публикация: *Persoonia* (2015)
Impact factor 5.7



II. Дрожди асоциирани с насекоми.

Насекомите са събирани от различни региони в България, през април-май, 2009 г

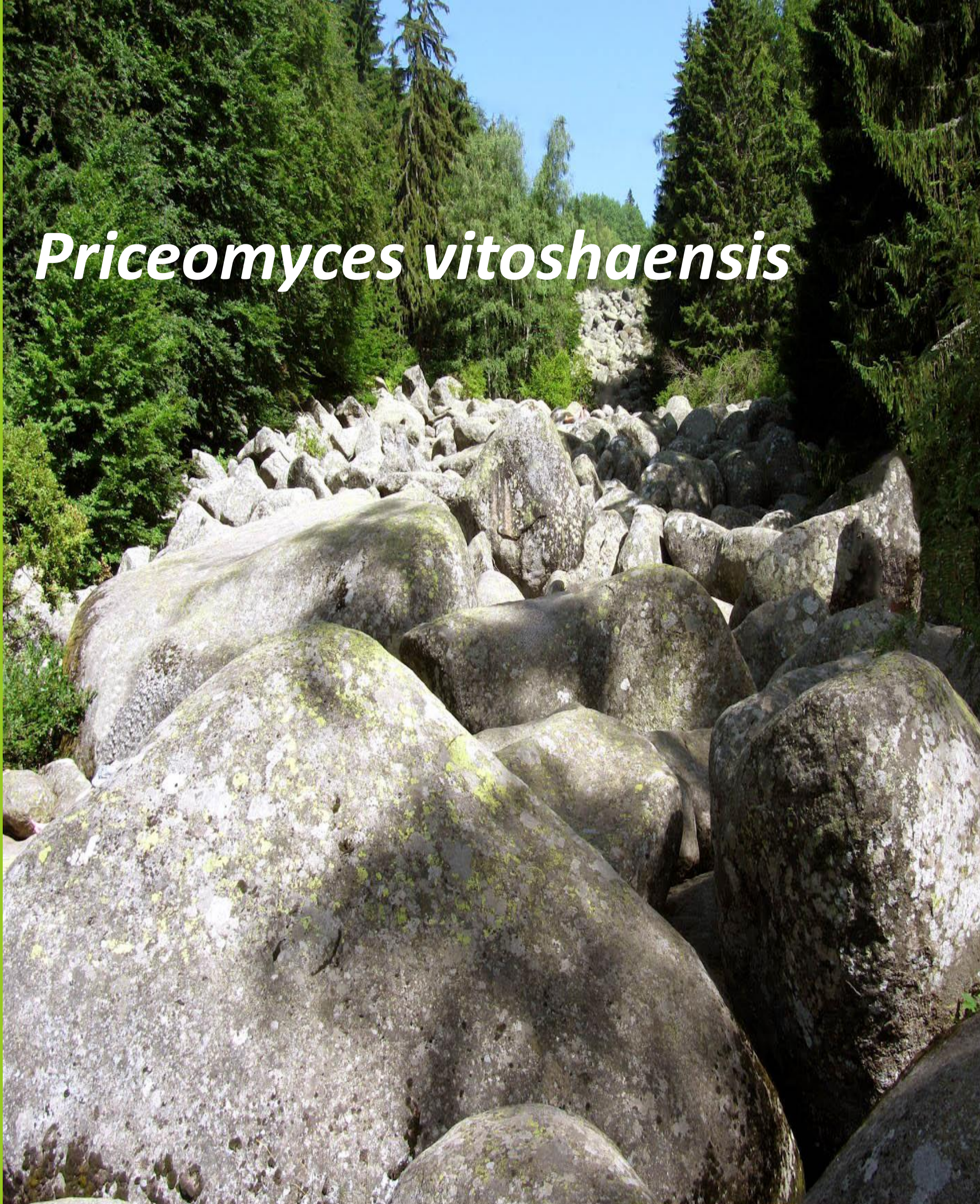


Таблица 2. Дрождеви щамове изолирани от насекоми.

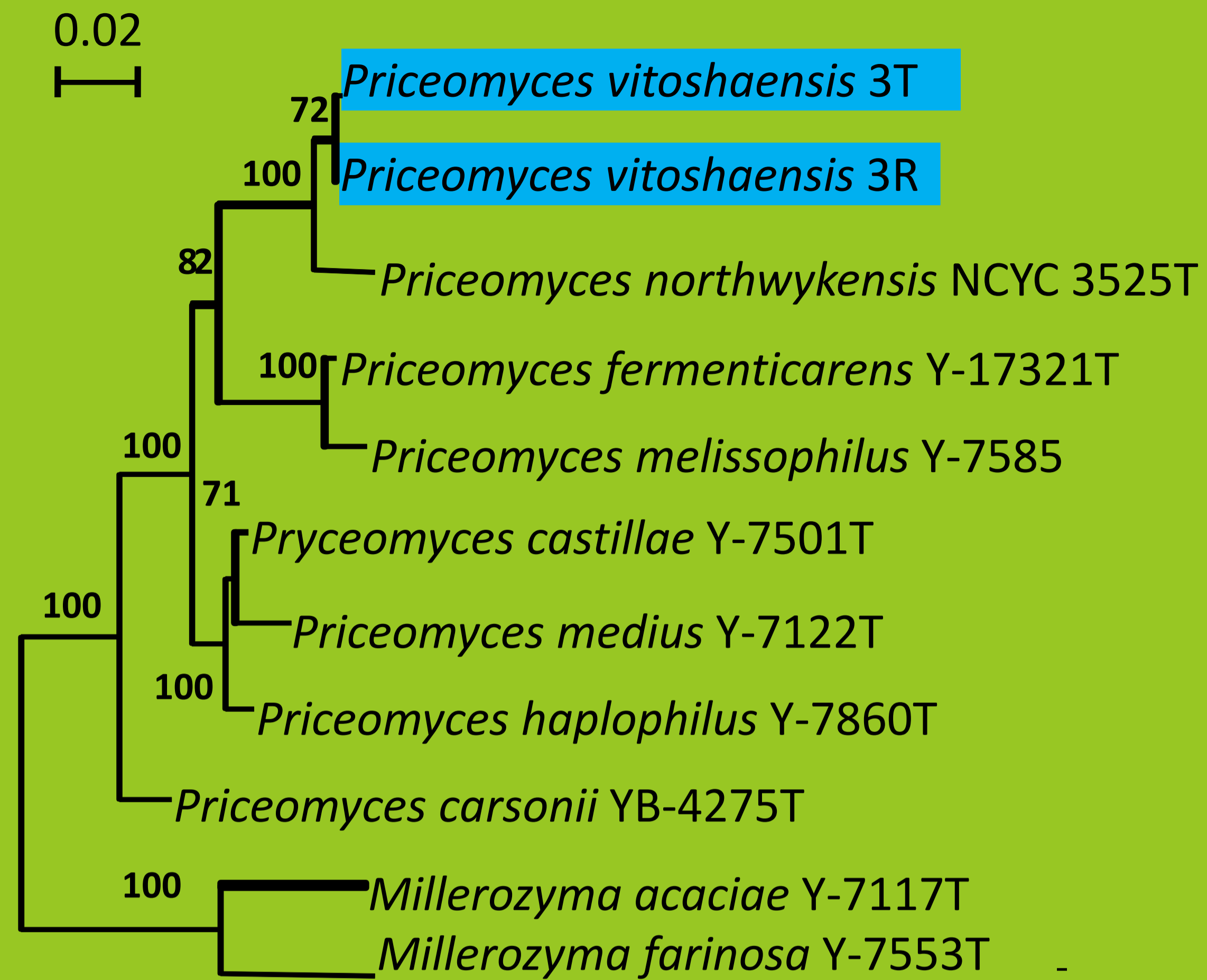
Щам	Маркери	Най-близък вид в ГенБанк	% на сходство
4	26S рPHK	<i>Kazachstania unispora</i>	95%
	ITS	<i>Kazachstania zonata</i>	86%
15	26S рPHK	<i>Candida sp.</i>	87%
	ITS	<i>Candida rugosa</i>	87%
24	26S рPHK	<i>Candida sp.</i>	87%
	ITS	<i>Candida rugosa</i>	80%
37	26S рPHK	<i>Candida parapsilosis</i>	96%
	ITS	<i>Candida sp.</i>	88%
37R	26S рPHK	<i>Candida parapsilosis</i>	96%
	ITS	<i>Candida sp.</i>	87%
300	26S рPHK	<i>Candida sp.</i>	85%
	ITS	<i>Candida sp.</i>	90%
301	26S рPHK	<i>Candida bolitotheri</i>	96%
	ITS	<i>Candida bolitotheri</i>	87%
KUZ1	26S рPHK	<i>Candida bolitotheri</i>	96%
	ITS	<i>Candida bolitotheri</i>	88%
Z1_1	26S рPHK	<i>Candida sp.</i>	86%

Общо 202 насекоми бяха събрани от различни части на България. От тях 106 са твърдокрили насекоми Coleoptera, а останалите са представители на други разреди насекоми Lepidoptera, Diptera, Ortoptera, Hemiptera, Heteroptera, Himenoptera.

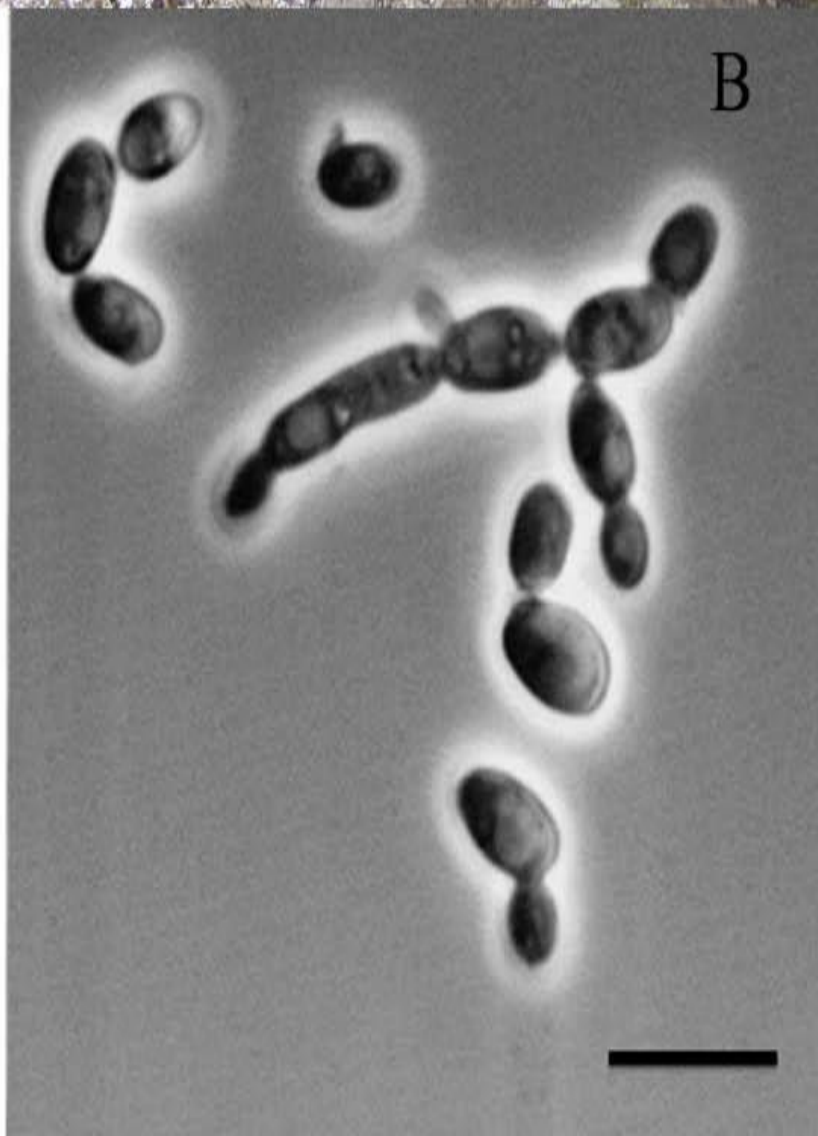
Изолирахме над 100 щамове дрожди. Част от новоизолираните щамове представляват 15 нови вида дрожди за наука.



Priceomyces vitoshaensis



Фиг. 8. Филогенетично дърво получено чрез използване на комбиниран анализ на секвенциина 26S рРНК и ITS участъци



Pterostihus melas, Carabidae

Природен парк Витоша

Публикация: Persoonia, 2016
Impact Factor 7.5

Yarrowia parophonii

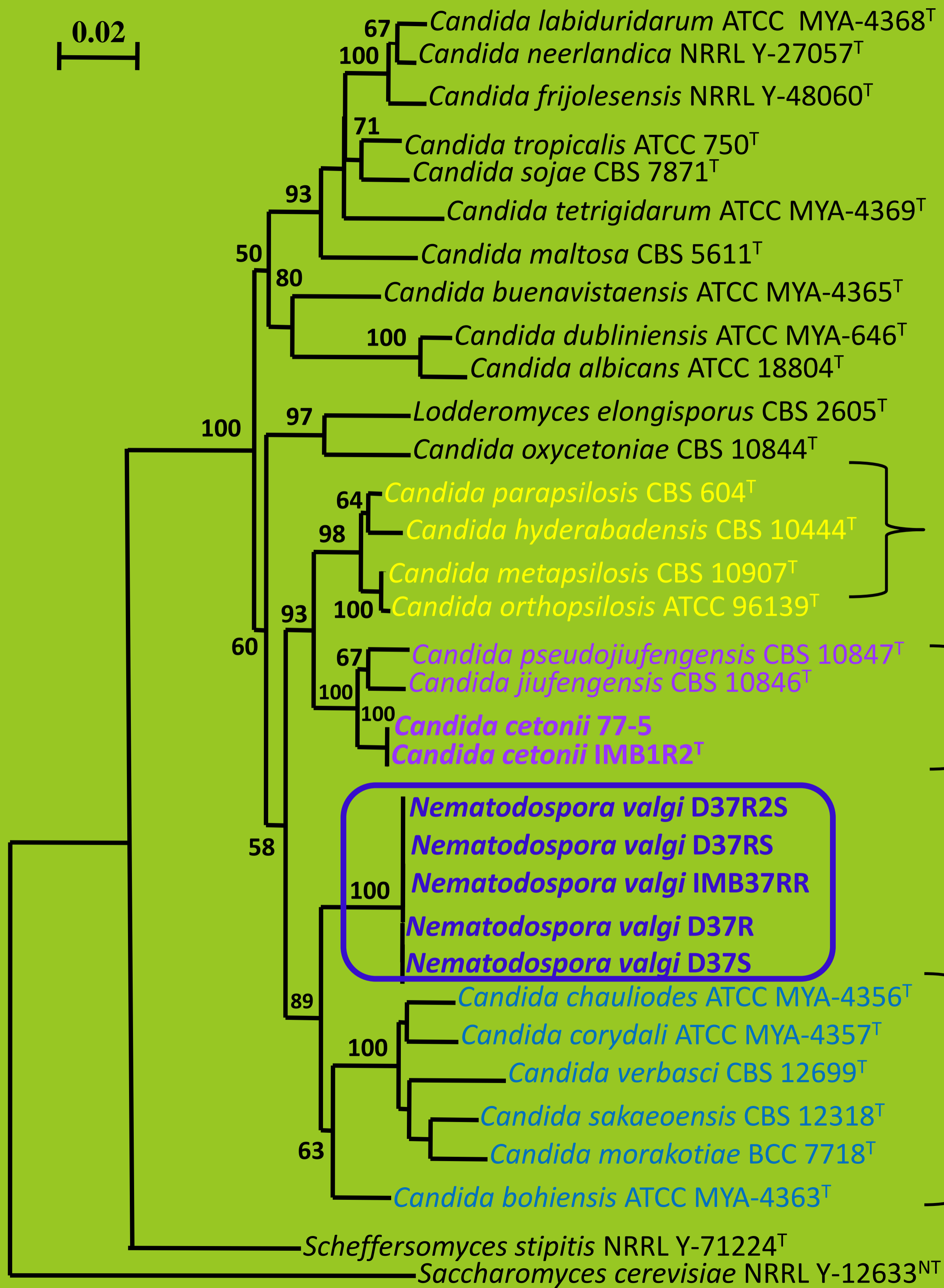


Paraphonus hirsutulus, Carabidae

Публикация: Persoonia (2017) Impact Factor 8.2

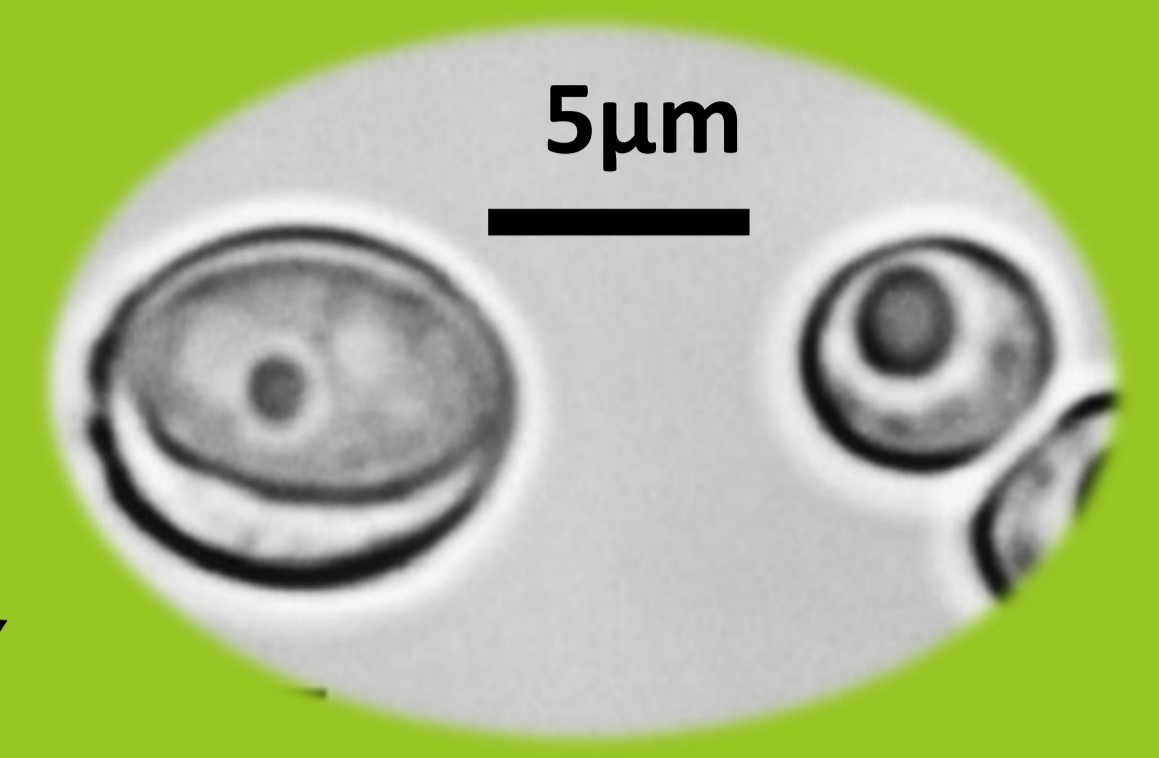
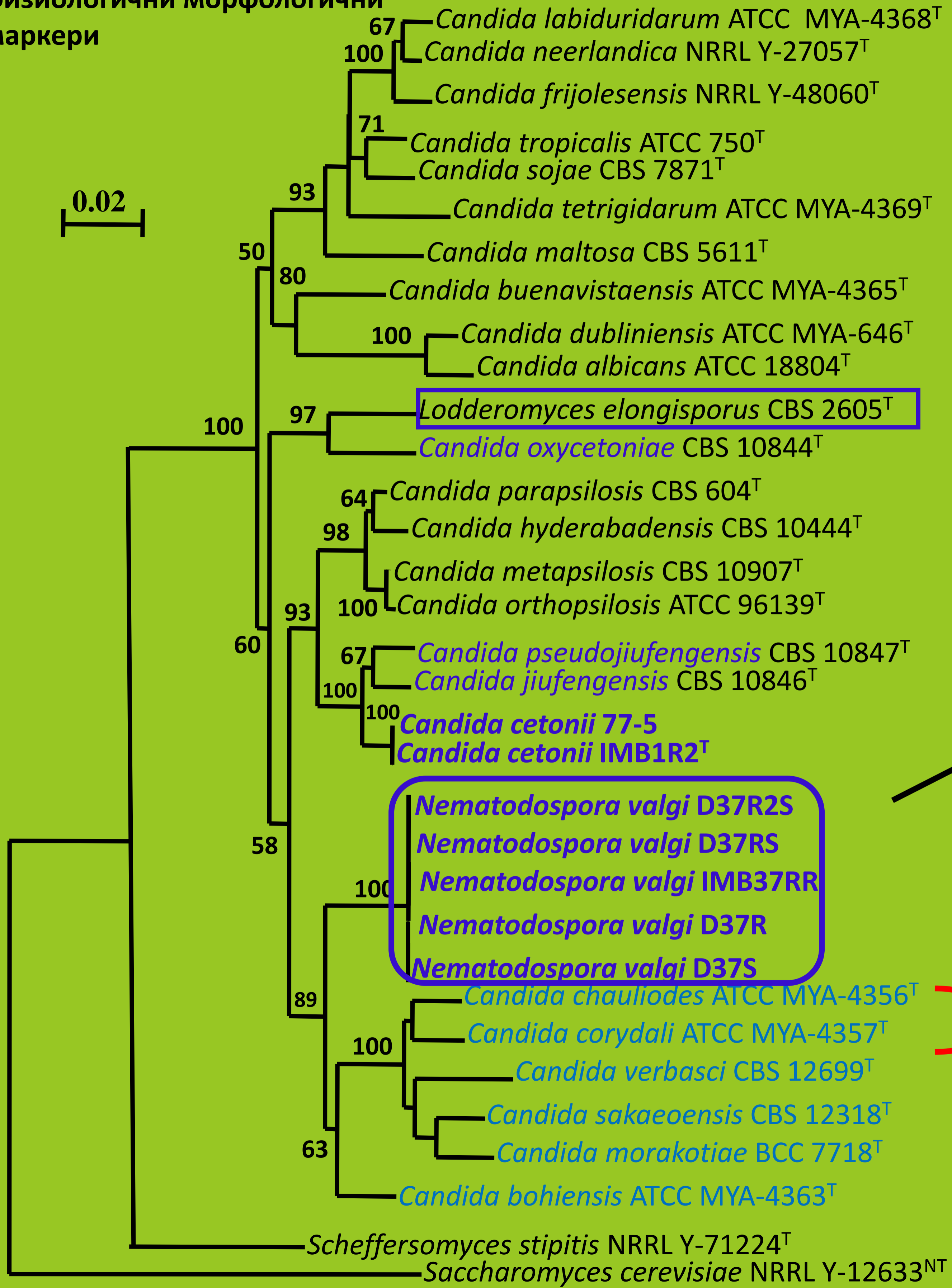


Фиг. 9. Филогенетично дърво получено чрез използване на комбиниран анализ на секвенции на 26S рРНК и ITS участък



Фиг. 10. Филогенетично дърво получено чрез използване на комбиниран анализ на секвенции на 26S рНК и ITS участъци. Сравнителен анализ на нуклеотидни последователности на маркери.

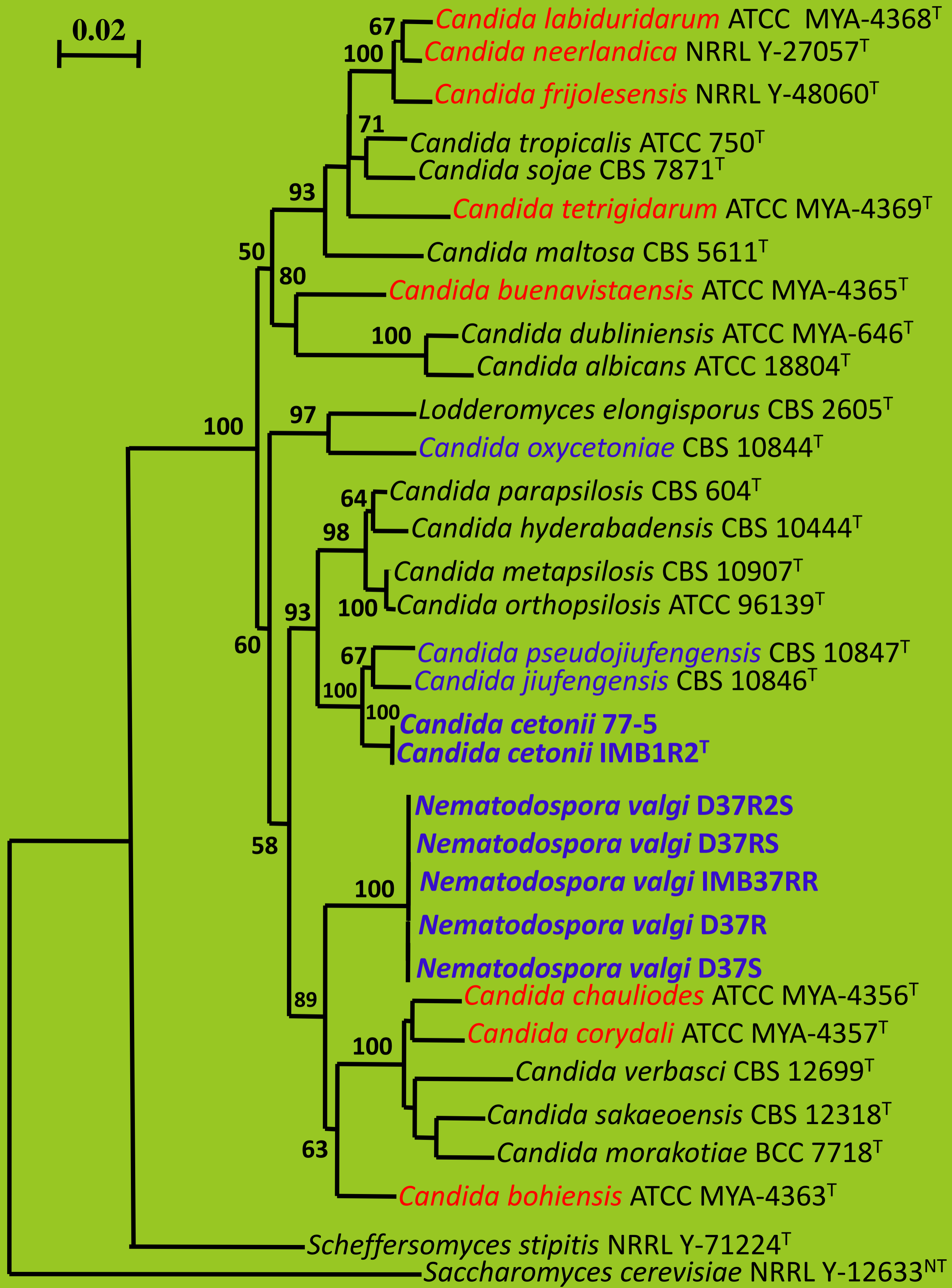
Фиг 11. Сравнителен анализ на физиологични морфологични маркери



Nematodospora valgi D37R2S
Nematodospora valgi D37RS
Nematodospora valgi IMB37RR
Nematodospora valgi D37R
Nematodospora valgi D37S

11

8



Фиг. 12. Филогеографско разпределение на дрожди изолирани от насекоми обитаващи в различни региони

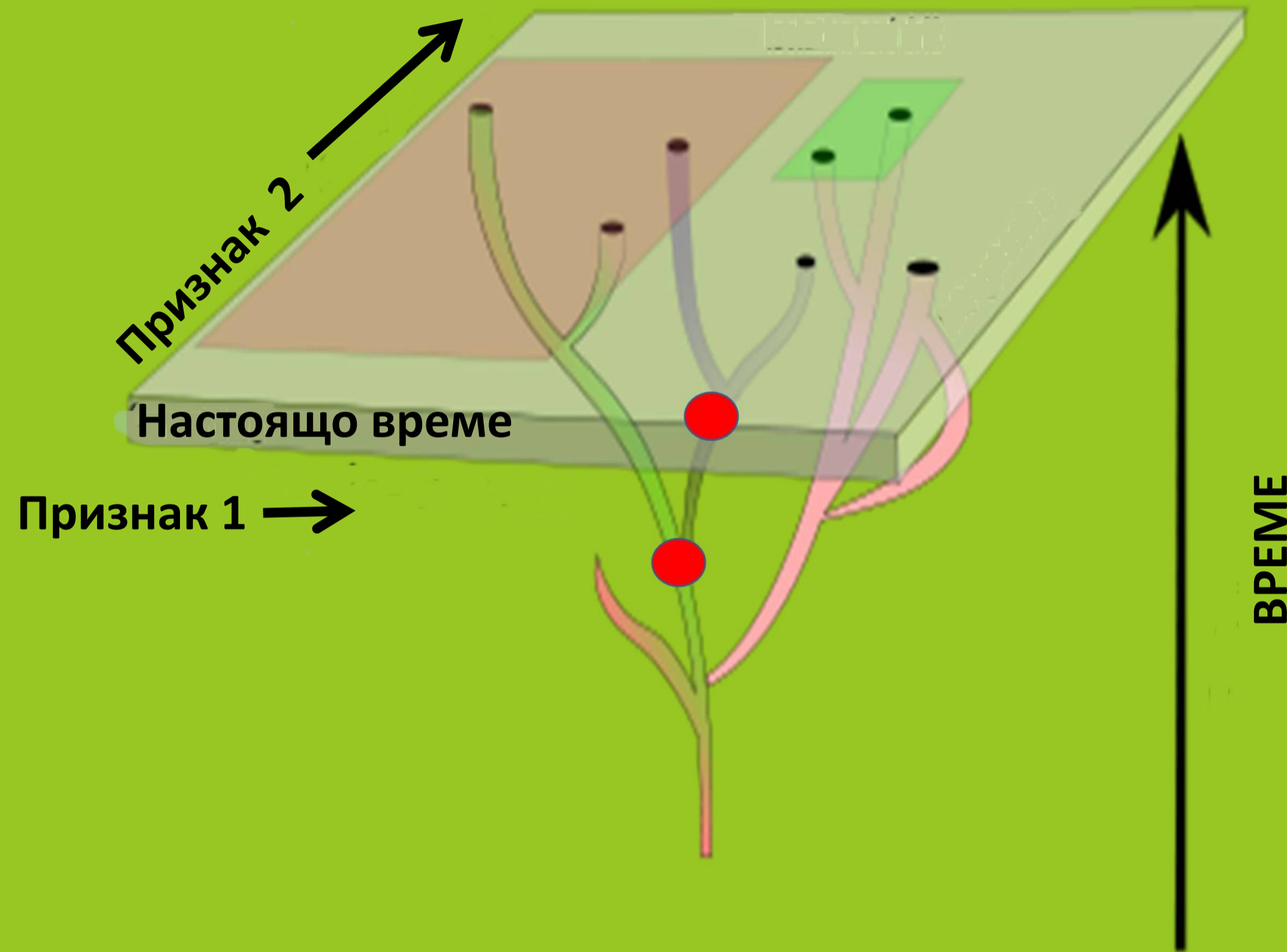
North America

Eurasia

North America

Публикация: Fungal Biology 2015
 Impact factor 2,26
 Цитирана в Annual Review of Microbiology, 2017

Проблеми в съвременната класификация на организмите

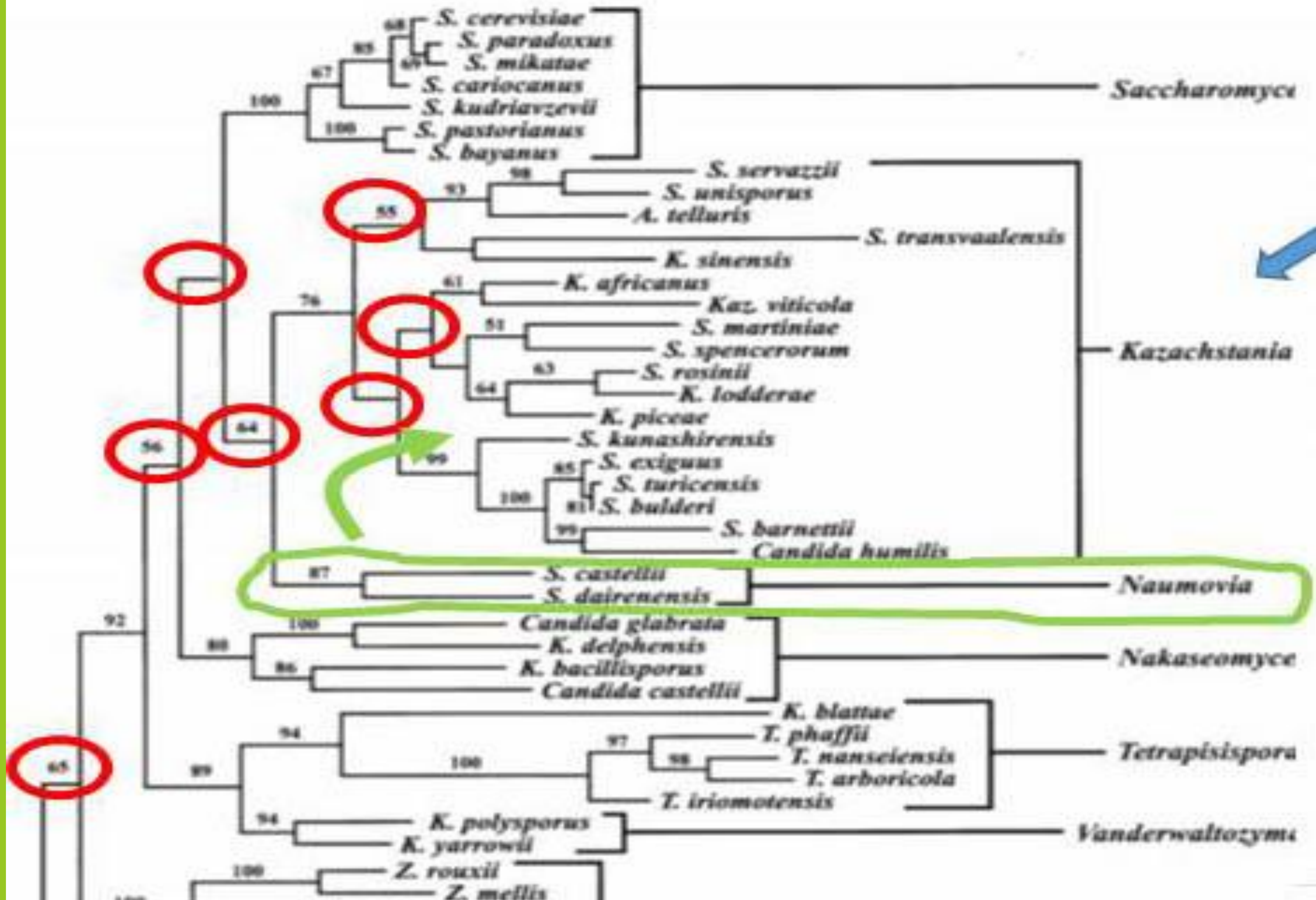


Класификация на Карл Линей

- ✓ Всяка таксономична единица от висок ранг включва таксономична единица с по нисък ранг.
- ✓ Кластериране на таксономични единици се осъществява въз основа на фенотипни характеристики които имат ниска разделителна способност.

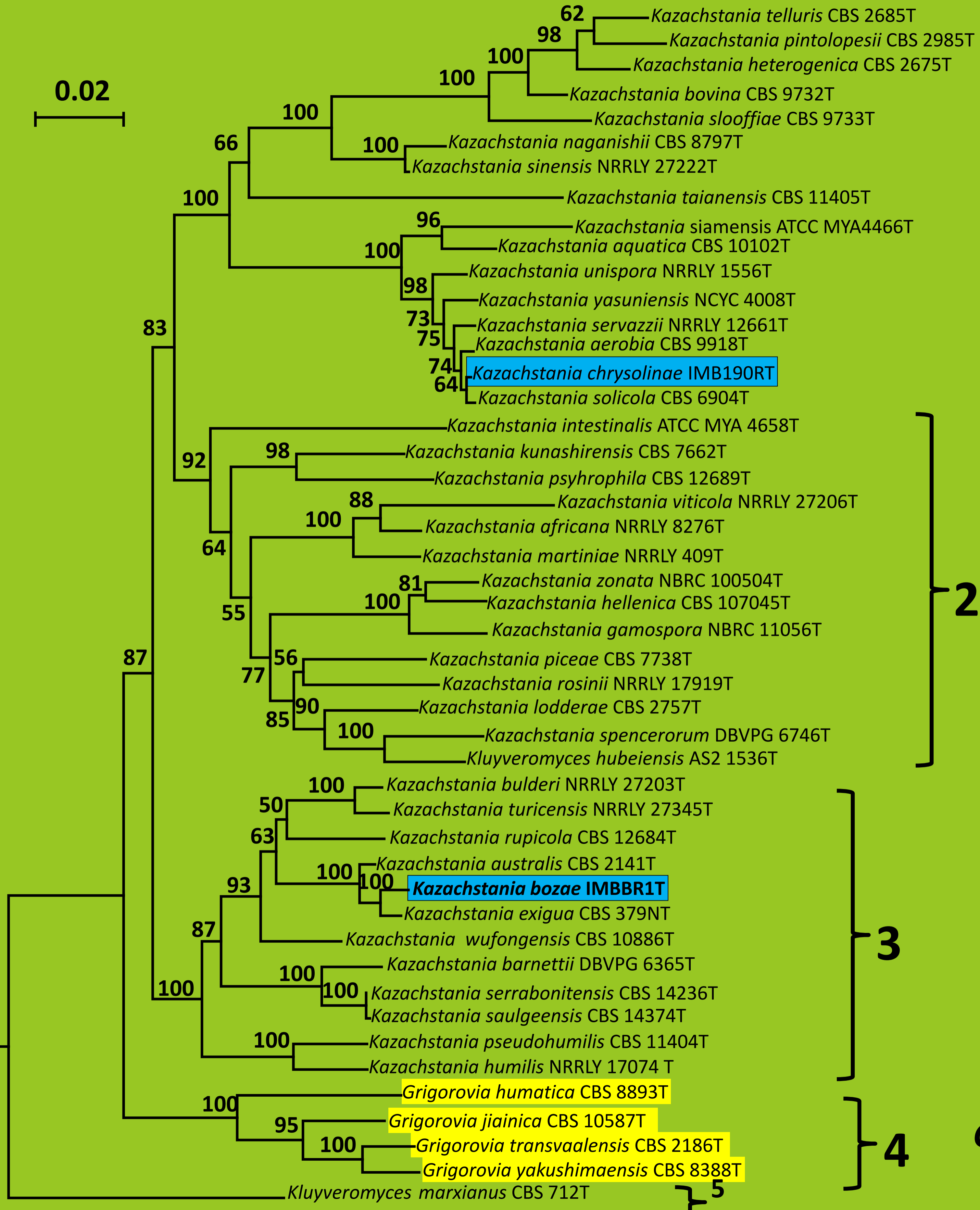
Филогенетичния анализ

- ✓ конструиране на система на К. Линей чрез построяване на филогенетично дърво.
- ✓ Всяка таксономична единица отговаря на групиране на видовете в кладовете които имат общ прародител.
- ✓ Проблема – прародители имат ниска статистическа поддръжка.



Фиг.13. Филогенетично дърво на видове от *Saccharomyces* complex въз основа на MLST анализ на 18S, 5.8S, ITS, 26S, EF-1a, митохондриална рДНК и COXII. С. Kurtzman FEMS YEAST RES. 4, 2003.

0.02



Фиг. 14. Филогенетично дърво на видове от род *Kazachstania* въз основа на комбиниран анализ на ITS и 26S рДНК.

1

2

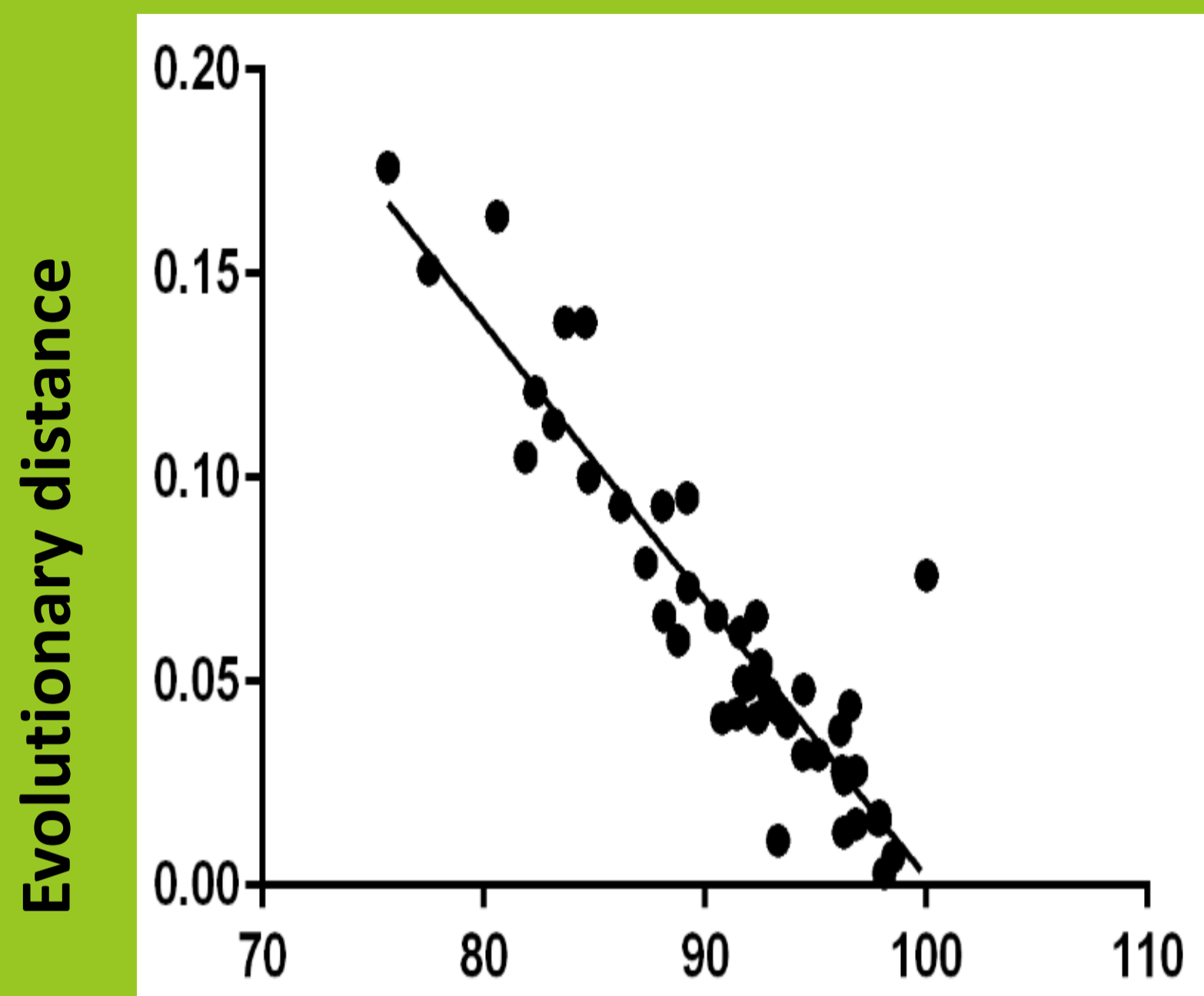
3

4

Grigorovia

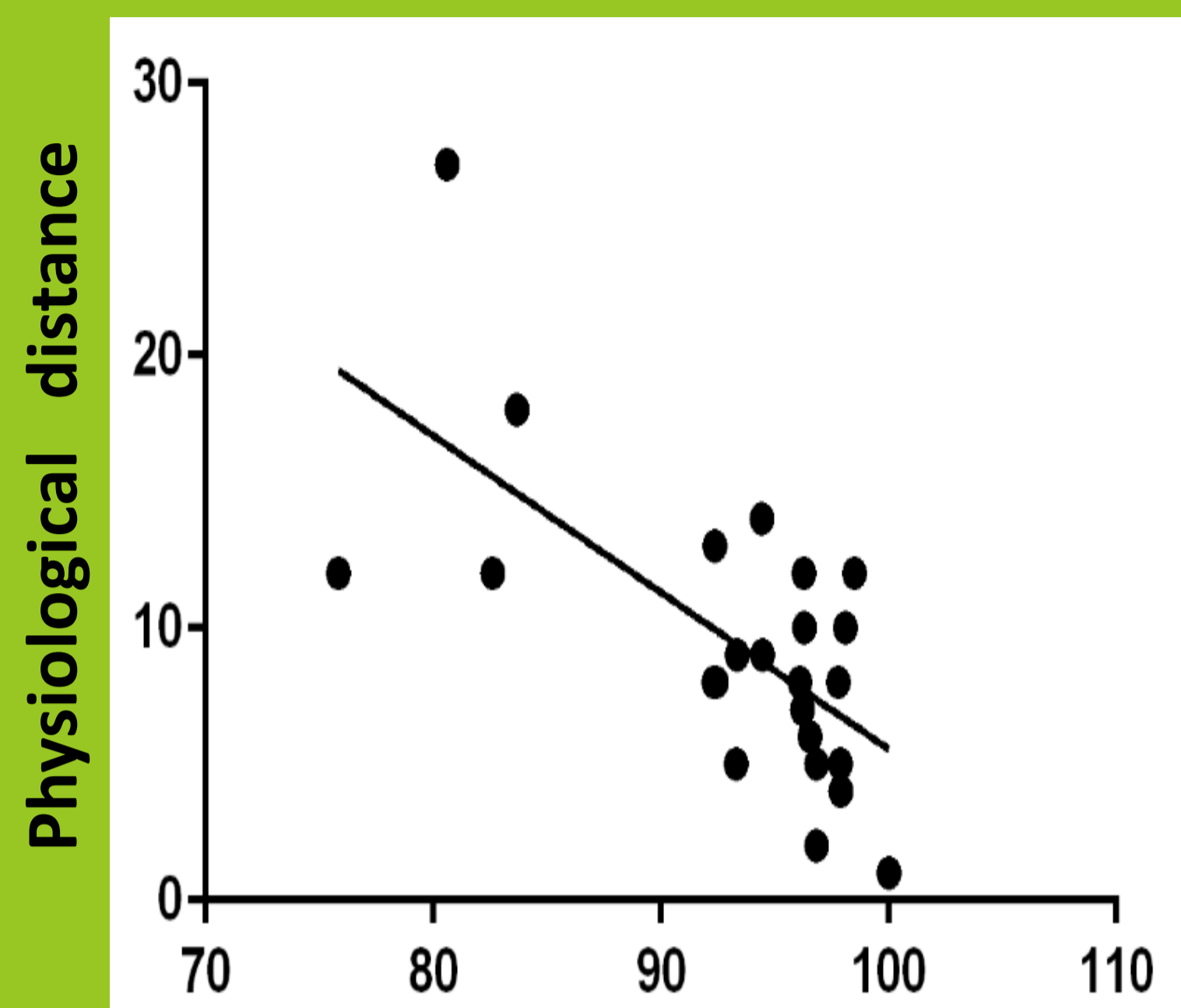
5

A



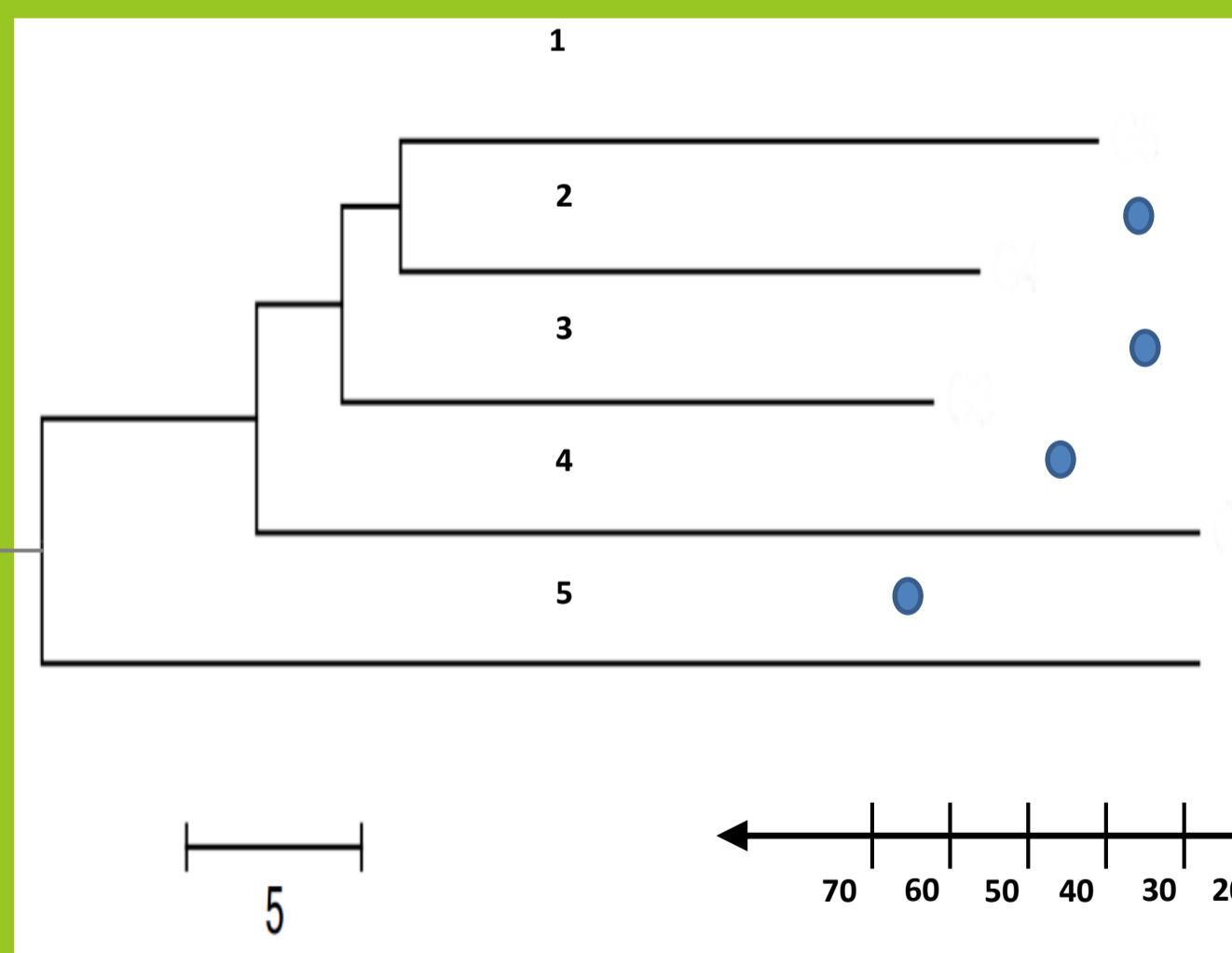
83,7% Sequence identity 98,5%

B



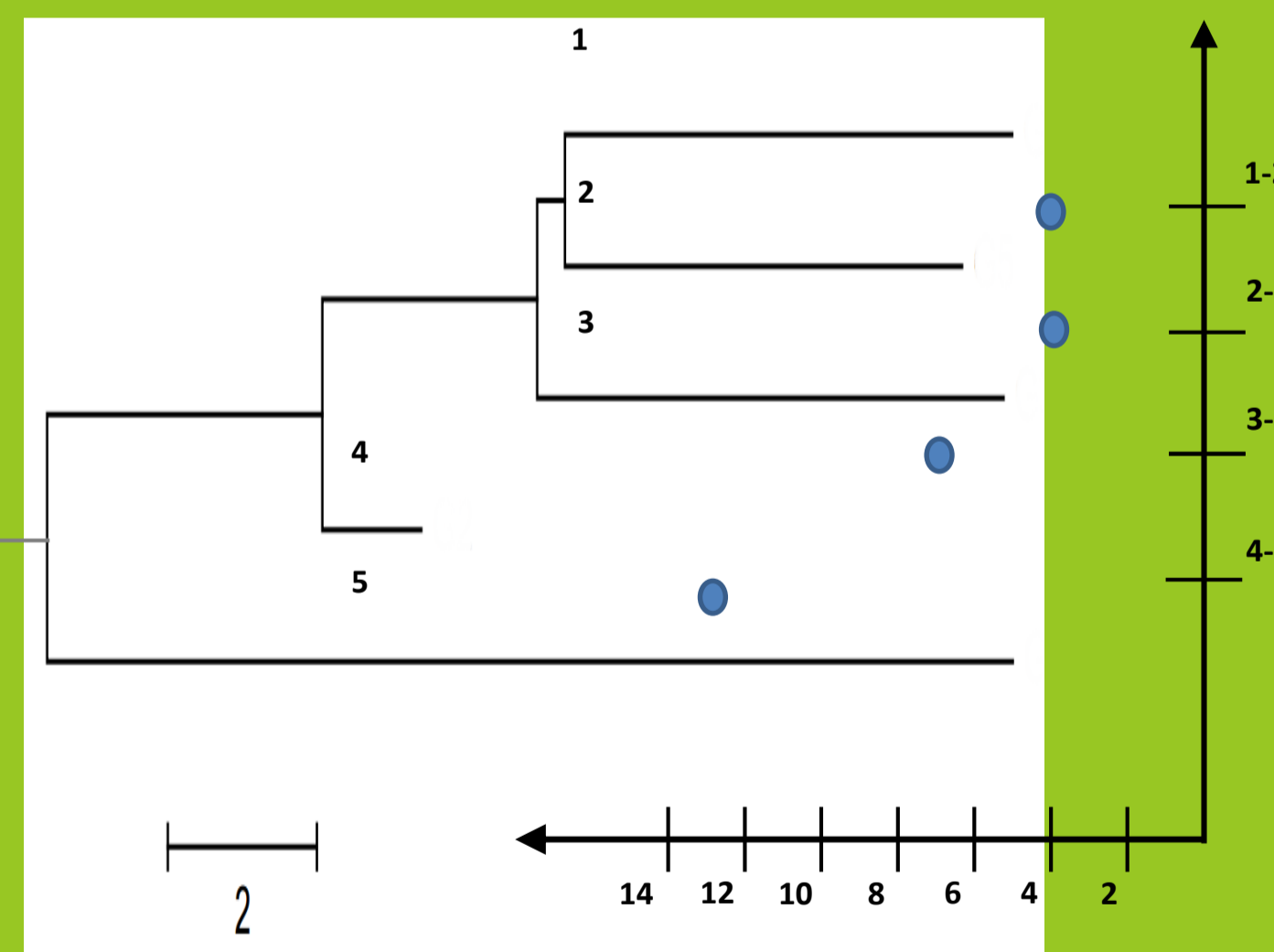
18 Sequence identity 6

Clusters

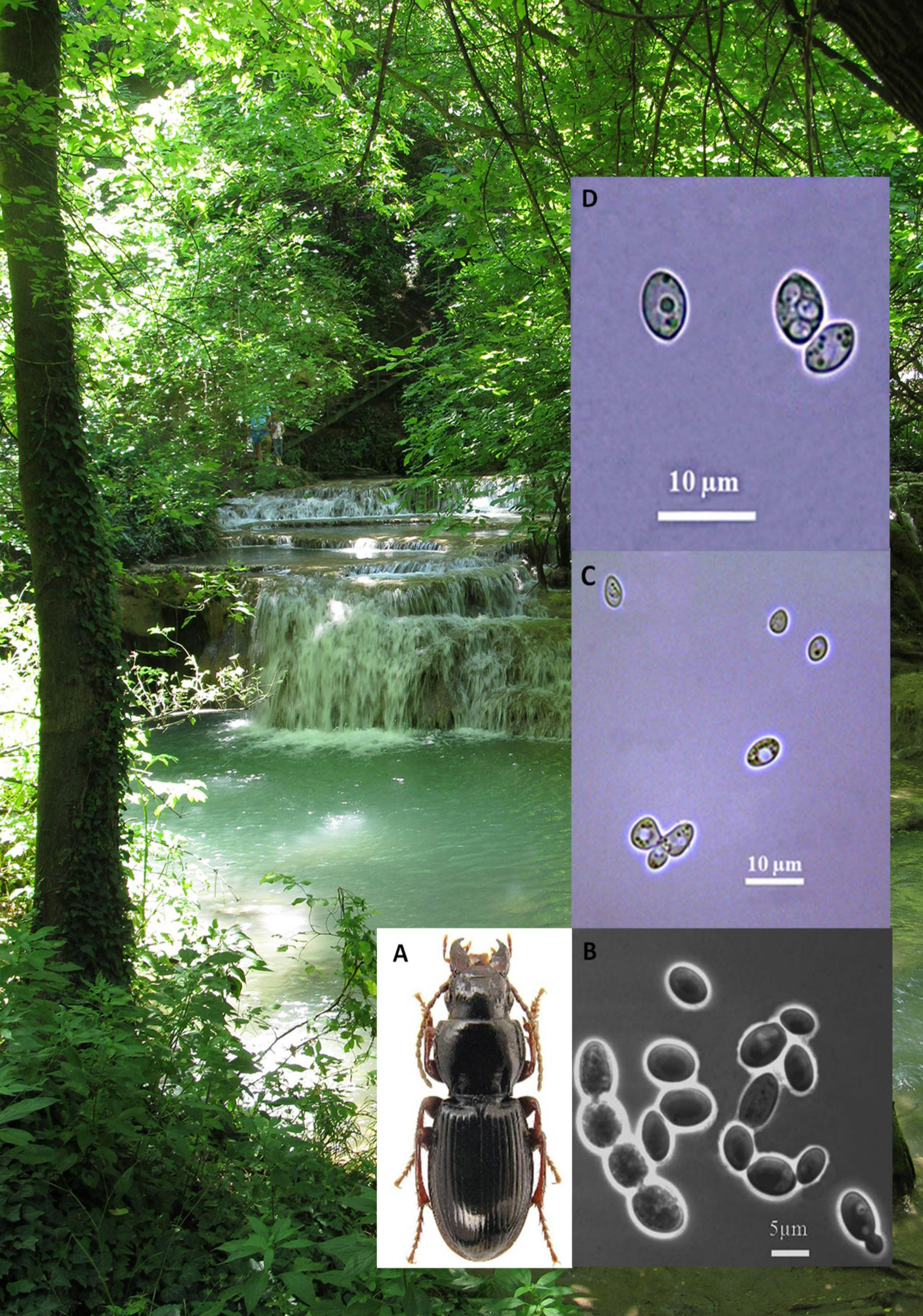


Evolutionary dendrogram

Clusters

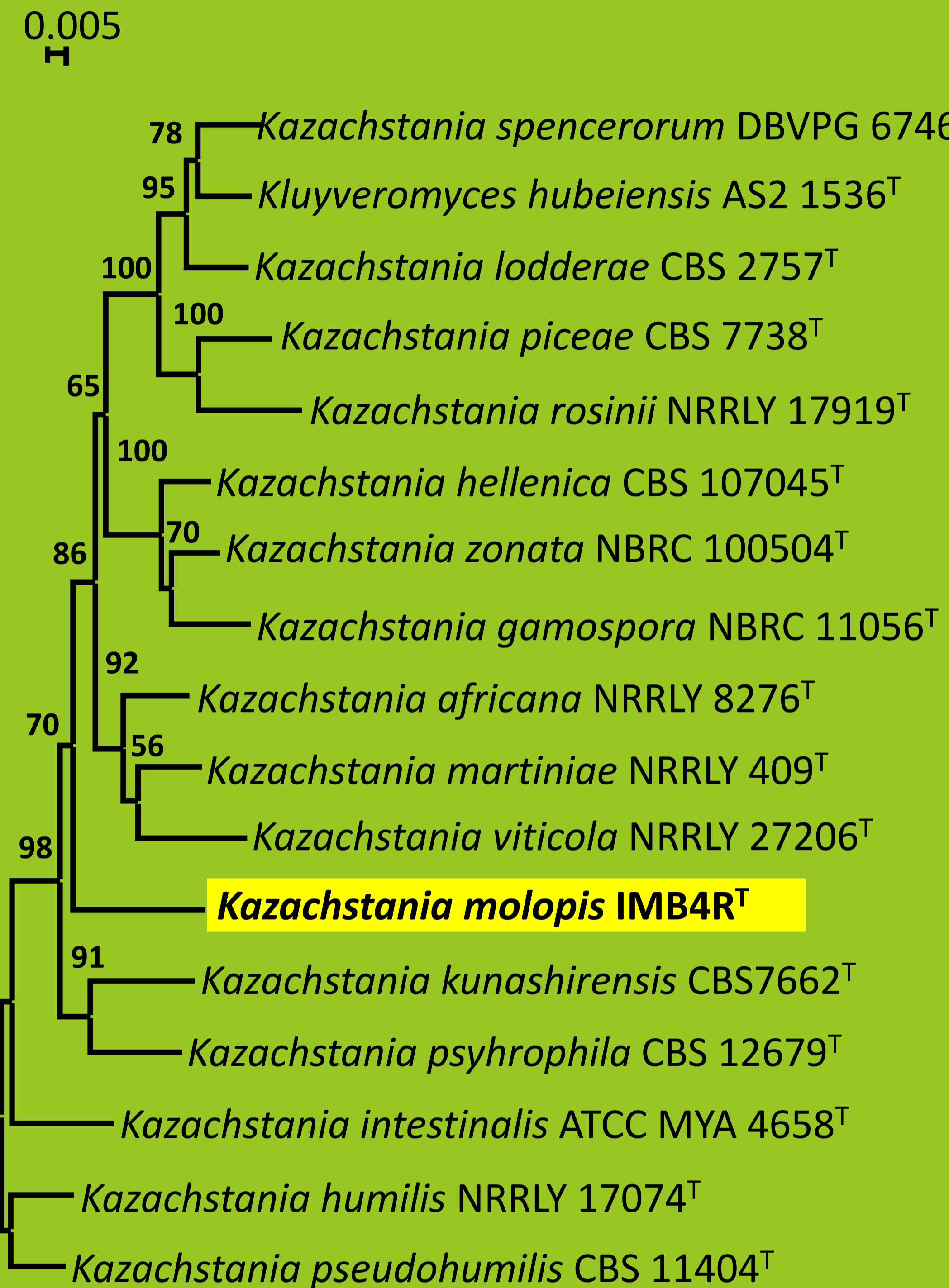


Physiological dendrogram



Molops piceus, Carabidae

Публикация: Persoonia 2019,



Фиг. 15. Филогенетично дърво получено чрез използване на комбиниран анализ на секвенции на 26S рРНК и ITS участъци

ДНК баркод анализ на дрожди изолирани от животни от зоологическа градина в София, България

Таблица 3 Дрождеви щама изолирани от животни



Генета



Мусанг



Сервал



Антилопа Адакс



Сурикати



Патагонска мара

Щам	Най близкия щам от ГенБанк	% на сходство	Гостоприемник
IM 2K	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99%	мусанг
IM 2B	<i>Clavispora lusitaniae</i>	99%	мусанг
IM 3	<i>Pichia kluyveri</i> var. <i>kluyveri</i>	99%	мунгос
IM 3-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99%	мунгос
IM 4	<i>Candida alimentaria</i>	99%	ягуар
IM 5	<i>Candida alimentaria</i>	99%	сервал
IM 6	<i>Pichia fermentans</i>	99%	генета
IM 6R	<i>Pichia fermentans</i>	99%	генета
IM 8	<i>Zygowilliosis californica</i>	99%	мунгос
IM 8-1	<i>Trichosporon laibachii</i>	100%	мунгос
IM 8-2	<i>Galactomyces geotrichum</i>	99%	мунгос
IM 9	<i>Zygowilliosis californica</i>	99%	сурикати
IM 10W	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99%	патогон.мара
IM 10Y	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99%	патогон.мара
IM 13-2	<i>Cryptococcus victoriae</i>	99%	кенгуру
IM 13R	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100%	кенгуру
IM 13W	<i>Zygowilliosis californica</i>	99%	кенгуру
IM 14-1	<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	99%	кенгуру
IM 16-1	<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	99%	зебра
IM 18-1	<i>Guehomyces pullulans</i>	100%	адакс
IM 18R	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100%	адакс
IM 18W	<i>Cryptococcus magnus</i>	99%	адакс
IM 19	<i>Galactomyces geotrichum</i>	99%	слон
IM 19-2	<i>Debaryomyces hansenii</i>	99%	слон
IM 19-3	<i>Debaryomyces hansenii</i>	99%	слон

Екстрацелуларните ензимни активности:
 два щама - амилолитична активност,
 шест щама - протеолитична активност,
 четиринадесет щама - липолитична активност.

Способността да растат при висока температура:
 Всички дрождеви щамове могат да растят при
 37 ° C.
 Четири щама - при 42 ° C.
 Два щама - при 45 ° C.

ДНК баркод анализ на дрождеви щамаи изолирани от традиционни български хранителни продукти

- ✓ Хранителната вкусова промишленост има огромна икономична стойност.
 - ✓ Замърсяване на храни има огромно влияние върху здравето на хора.
- Основни дрождеви замърсители на храни: *Z. bailii*, *C. parapsilosis*, *P. membranifaciens*, *D. hansenii* и *R. mucilaginosa*.



Като част от нормалната ежедневна консумация на храни, хората поглъщат голямо количество разнообразни дрожди без отрицателно въздействие върху здравето им.

Независимо от това се изисква повишено внимание – *E. coli* не се счита за сериозен хранителен патоген преди 35 години, но сега е класирана в категория на патогени с висок риск.

Също така има данни, показващи корелация между наличието на дрожди в храните и алергичните и свръхчувствителни реакции при хора. Освен това хората с слабо здраве и имунната система (пациенти със СПИН и рак) имат най-голям риск на дрождеви инфекции предизвикани от *C. parapsilosis*, *K. marxianus*, *S. cerevisiae* и *R. mucilaginosa*.

Таблица 4. Дрождеви щамаи изолирани от български храни.

Щамаи	Най близък вид от ГенБанк	Храна	% на идентичност на 26S рРНК/ITS маркери
IMB80	<i>Isatchenkia orientalis</i>	боза	99%/99%
IMB81	<i>Candida inconspicua</i>	боза	99%/99%
IMBBR1	<i>Kazachstania exigua</i>	боза	99%/96%
IMBBR2	<i>Kazachstania exigua</i>	боза	99%/96%
IMBZ2-1	<i>Pichia fermentans</i>	боза	99%/99%
IMBZ2-2	<i>Pichia fermentans</i>	боза	99%/99%
IMB1	<i>Kluyver. marxianus</i>	сирене	99%/99%
IMC1	<i>Sacch.cerevisiae</i>	сирене	99%/99%
IM95	<i>Kluyver. marxianus</i>	сирене	99%/99%
IM7	<i>Sacch.cerevisiae</i>	сирене	99%/99%
IM4	<i>Rhod-a mucilaginosa</i>	сирене	99%/99%
IMA6	<i>Kluyver. marxianus</i>	кисело мляко	99%/99%
IMH7	<i>Sacch.cerevisiae</i>	кисело мляко	99%/99%
IMH8	<i>Kluyver. marxianus</i>	кисело мляко	99%/99%