

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

P19-88-672

А.В.Глазунов, А.В.Борейко, А.Х.Эссер

ОТНОСИТЕЛЬНАЯ КОНКУРЕНТОСПОСОБНОСТЬ
ГАПЛОИДНЫХ И ДИПЛОИДНЫХ
ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК
ПРИ РОСТЕ В СМЕШАННОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Направлено в журнал "Микробиология"

1988

Дрожжевые клетки являются удобным объектом для изучения вопросов, связанных с эволюционной ролью пloidности, так как имеют вегетативную гаплоидную и диплоидную фазы. Вопрос об эволюционном переходе организмов из гаплоидного в диплоидное состояние обсуждается давно ^{/4,9,10/}, но не вполне ясен. Очевидно, что случайно диплоидизировавшаяся клетка может закрепиться в популяции гаплоидов лишь в том случае, если имеет перед последними селективные преимущества. Попытки выявить эти преимущества при совместном культивировании гаплоидных и диплоидных клеток *Saccharomyces cerevisiae* в хемостате не принесли успеха, причем в случае лимита по органическому фосфату преимущества имели гаплоидные клетки ^{/8/}. С другой стороны, при длительных пересевах в музее петергофской коллекции дрожжей ^{/3/} без контроля пloidности большинство из проверенных /около 70%/ культур "самодиплоидизировались", что позволяет предположить селективные преимущества автодиплоидов перед гаплоидными клетками.

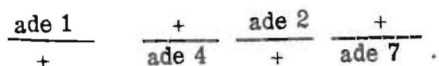
Делая естественное предположение о зависимости конкурентоспособности клеток от условий культивирования, можно ввести понятие n -мерного пространства режимов культивирования, под которым будем понимать совокупность n -независимых параметров /факторов/ внешней среды $\{X_1, X_2, \dots, X_n\}$. Определив функцию конкурентоспособности $K = K(X_1, X_2, \dots, X_n)$ одного штамма в условиях совместного культивирования с другим, можно попытаться найти ее локальные экстремумы, т.е. указать области пространства режимов, в которых один из изучаемых штаммов /в нашем случае - гаплоид или диплоид/ имеет преимущества. Один из способов определения функции конкурентоспособности будет дан ниже. Очевидно, что задача определения размерности пространства режимов на данный момент не может быть решена, но варьируя некоторые основные параметры и считая, что остальные фиксированы, можно получить информацию о поведении функции K .

Целью нашей работы явилось выявление условий культивирования /областей пространства режимов культивирования/, при которых диплоидные клетки вытесняют гаплоидные из смешанной популяции. Описание таких областей /а это задача чрезвычайно сложная и не может, конечно, быть ограничена рамками одной статьи/ позволило бы выдвинуть обоснованную гипотезу о закреплении диплоидной фазы в ходе биологической эволюции.

В работе использован метод "квазинепрерывного" культивирования дрожжевых клеток: клеточные суспензии периодически разбавляли свежей средой в течение длительного времени, при этом измеряли соотношение гаплоидов и диплоидов в смешанной популяции. Оказалось, что при некоторых использованных режимах культивирования диплоидные клетки *Saccharomyces cerevisiae* имеют селективные преимущества перед гаплоидными, то есть вытесняют последних из смешанной популяции. Вытеснение гаплоидного штамма происходит в течение длительного времени культивирования /более 100 генераций/. Для дрожжей *Pichia pinus* при культивировании в минимальной среде гаплоиды вытесняют диплоидные клетки из смешанной популяции, в то же время в этих условиях не выявлено преимуществ гаплоидного или диплоидного штамма *S. cerevisiae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы штаммы дрожжей *S. cerevisiae* дикого типа: гаплоидный S288C и родственный ему диплоидный XS800 из коллекции Р.К.Мортимера /Беркли, США/. Кроме того, использованы гаплоидный и диплоидный штаммы дрожжей *P. pinus* MN4 /дикий тип/ и 190x356



Клетки *S. cerevisiae* культивировали в колбах с аэрацией или в пробирках без перемешивания в наклонном положении в богатой среде YEPD /пептон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, глюкоза 20 г/л/ или обедненной среде БС /пептон 0,1 г/л, дрожжевой экстракт 0,05 г/л, глюкоза 0,2 г/л/, а также в минимальной среде МС / KH_2PO_4 1г/л, $MgSO_4$ 0,5 г/л, $NaCl$ 0,1 г/л, $CaCl_2$ 0,1 г/л, $(NH_4)_2SO_4$ 3,5 г/л, глюкоза 20 г/л, витамины, микроэлементы/ при разных температурах.

Клетки *P. pinus* культивировали в минимальной среде МС.

Для приготовления смешанной культуры гаплоидные и диплоидные клетки инкубировали в среде в течение нескольких суток с ежедневным пересевом в свежую среду, после чего смешивали в соответствующей пропорции. Через определенные промежутки времени клетки *S. cerevisiae* клонировали на твердой среде YEPD, затем клоны перепечатывали на чашки с той же средой, на поверхность которой предварительно было высеяно приблизительно 10^7 клеток тестерного штамма 22Г-П3238 /a lys2-A12 metA1 his3 RAP 5Sa1/, гиперчувствительного к α -фактору ^{12/}. Гаплоидные клетки α -типа спаривания образуют колонии, вокруг которых

имеется "ореол" /пространство, где отсутствует рост клеток тестерного штамма/, тогда как вокруг колоний клеток XS800 такого "ореола" не образуется. Частота спонтанного переключения локуса типа спаривания у гетероталлических дрожжей составляет 10^{-6} ^{18/}, поэтому приведенным выше способом можно надежно отличить гаплоид от диплоида в используемой системе.

Для определения пloidности дрожжей *P. pinus* клетки клонировали на среде Rg /пептон 0,2 г/л, дрожжевой экстракт 0,2 г/л, глюкоза 1 г/л, агар-агар 20 г/л/ ^{17/}. После выращивания на среде Rg диплоидные клоны приобретают "бурую" окраску, что свидетельствует о способности клеток к споруляции: гаплоидные клоны на среде Rg окраску не изменяют.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 приведена кривая роста смешанной культуры гаплоидных и диплоидных клеток S288C и XS800 в жидкой среде YEPD при 30° С. Исходно были смешаны экспоненциальные культуры гаплоидных и диплоидных клеток в соотношении 1:1. Параллельно в отдельных колбах культивировали гаплоидные и диплоидные клетки. Удельные скорости роста гаплоидной, диплоидной и смешанной культур составляют $0,50 \pm 0,03$, $0,50 \pm 0,04$ и $0,50 \pm 0,02$ ч⁻¹ /P > 0,95/ соответственно и, следовательно, не различаются в пределах ошибки измерений. Здесь же приведена доля диплоидов в смешанной популяции в зависимости от времени культивирова-

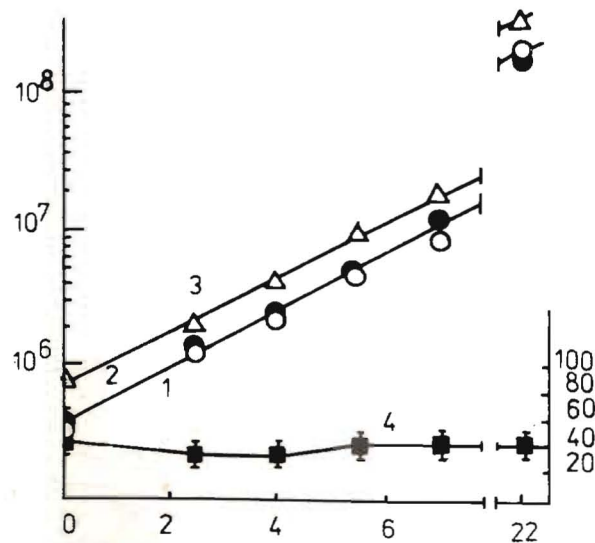


Рис. 1. Кривые роста гаплоидной /S288C/, диплоидной /XS800/ и смешанной популяции дрожжевых клеток *S. cerevisiae* в среде YEPD при 30° С. 1 — гаплоидные клетки; 2 — диплоидные клетки; 3 — смешанная популяция; 4 — доля диплоидов в смешанной популяции. По оси абсцисс — время, ч; по осям ординат — число клеток в 1 мл культуры /слева/ и доля диплоидных клеток в смешанной культуре, % /справа/.

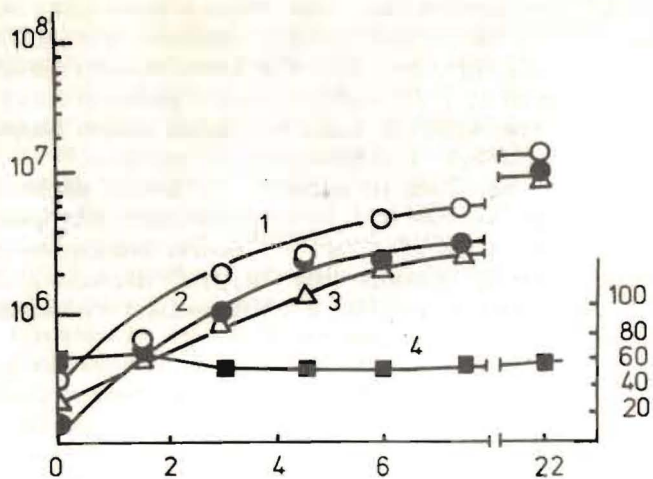


Рис. 2. Кривые роста гаплоидной, диплоидной и смешанной популяции дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* в среде БС при 30° С. Обозначения те же, что и на рис. 1.

ния: эта величина практически не изменяется. Аналогичные результаты получены при культивировании смешанной популяции в обедненной среде БС /рис. 2/. Клетки здесь во всех вариантах опыта дорастают до концентрации $1-2 \times 10^7$ клеток/мл, при этом доля диплоидных клеток в популяции практически не изменяется. Таким образом, параметры роста культуры двух штаммов весьма близки, что не дает возможности предполагать быстрое вытеснение одного из штаммов при росте в смешанной популяции. В связи с этим опыты по совместному культивированию гаплоидов и диплоидов проводили в течение длительного времени /более 100 генераций/ с тем, чтобы выявить незначительные различия в относительной конкурентоспособности рассматриваемых дрожжевых штаммов, причем для каждого варианта опыта проводили несколько независимых серий экспериментов.

На рис. 3 приведена зависимость доли диплоидных клеток XS800 в смешанной популяции "гаплоид/диплоид" при экспоненциальном росте в среде при 30° С. Культивирование проводили в колбах при интенсивном перемешивании, ежедневно разбавляя культуру свежей средой. Исходное соотношение гаплоидов и диплоидов составляло 1:1. Через каждые 24 ч роста смешанную культуру разводили до концентрации 1×10^2 клеток/мл, через сутки культивирования эта величина составляла $3-6 \times 10^8$ клеток/мл, что соответствует экспоненциальному участку кривой

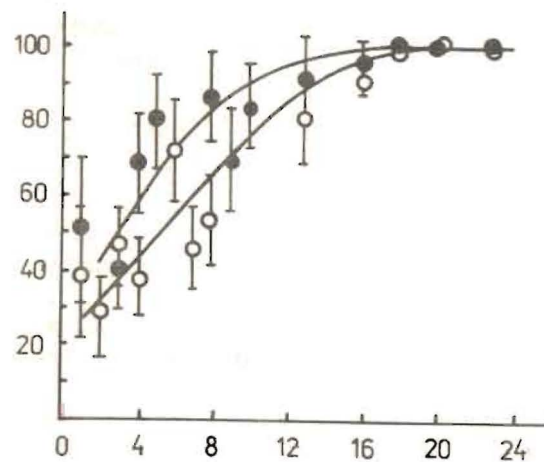
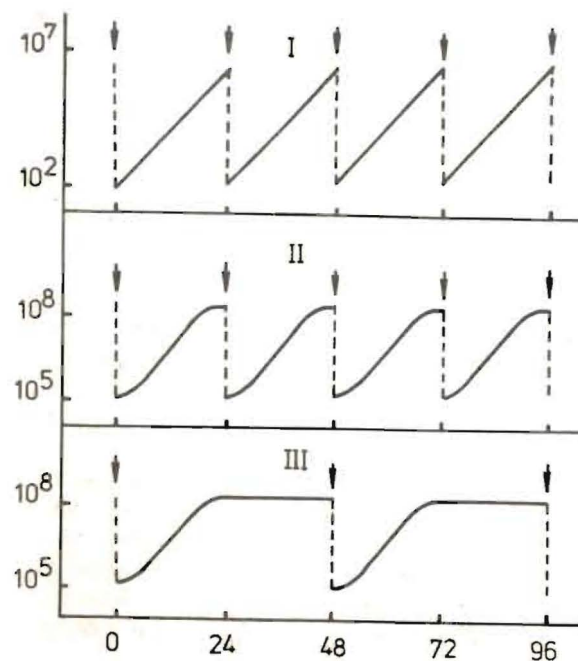


Рис. 3. Доля диплоидных клеток XS800 в смешанной популяции /S288C/XS800/ в зависимости от времени "квазинепрерывного" культивирования в среде YEPD при 30° С. При оси абсцисс - время, сутки; по оси ординат - доля диплоидных клеток, %.

роста для обоих штаммов /см. рис. 1/. Схематично использованный режим "квазинепрерывного" культивирования изображен на рис. 4 /I/. Лаг-фаза при пересеве клеток в свежую среду составляла не более 1 ч. На рис. 3 представлены результаты двух параллельных опытов. Как видно, через 20 сут. роста /около 300 генераций/ в популяции не остается гаплоидных клеток. Можно предположить, что вытеснение гаплоидных клеток из смешанной популяции происходит за счет не-



большой /которую мы не смогли выявить по кривым роста/ разницы в удельных скоростях роста двух штаммов. Пренебрегая небольшой лаг-фазой при пересеве культуры в свежую среду, можно оценить эту разницу в скоростях роста. Действительно,

Рис. 4. Режимы "квазинепрерывного" культивирования. Стрелками обозначены моменты разведения культуры свежей средой. По осям абсцисс - время, ч; по осям ординат - концентрация клеток в культуре.

при указанном режиме культивирования и исходном соотношении гаплоид: диплоид /1:1/ имеет место следующее соотношение:

$$\Delta\mu = \frac{1}{t} \ln \frac{C_2}{C_1}, \quad /1/$$

где C_1, C_2 - концентрации гаплоидов и диплоидов в смешанной популяции через время культивирования t ; $\Delta\mu$ - разность удельных скоростей роста гаплоидов и диплоидов.

В опыте, представленном на рис. 3, $\Delta\mu$ составляет $0,008 \pm 0,003 \text{ ч}^{-1}$ ($P > 0,95$) /переметр $\Delta\mu$ оценивали по кривой зависимости доли диплоидов в смешанной популяции от времени культивирования/. Легко видеть, что такая разница при скорости роста гаплоида, например, $0,50 \text{ ч}^{-1}$ за 7 ч культивирования при равных исходных концентрациях даст различия в конечных исходных концентрациях не более, чем на 4-8%, что, конечно, находится за пределами точности измерения концентрации клеток в наших опытах.

Вне зависимости от механизма вытеснения одного штамма другим, следующую величину можно определить здесь как относительную конкурентоспособность штамма 1 при совместном культивировании со штаммом 2, когда исходные концентрации клеток составляют 1:1

$$K = \frac{\tau}{t} \ln \frac{C_1}{C_2}, \quad /2/$$

где τ - время генерации смешанной популяции в данных условиях культивирования.

Легко видеть, что величина K может быть как положительной /положительная конкурентоспособность/, отрицательной /отрицательная конкурентоспособность/, так и равной 0. Последний случай отражает ситуацию, когда ни один из штаммов в смешанной культуре не имеет селективных преимуществ. В опыте, представленном на рис. 3, относительная конкурентоспособность K для диплоидов составляет $0,010 \pm 0,004$ / $P > 0,95$ /, то есть достоверно больше 0.

Можно представить, что диплоид выделяет в среду какие-либо продукты метаболизма, угнетающие рост гаплоида в смешанной культуре. В табл. 1 приведены скорости роста гаплоидов /диплоидов/ при культивировании в среде YEPD, приготовленной на культуральной жидкости, полученной после 1-суточного роста диплоидов /гаплоидов/ в среде YEPD. Как видно, скорости роста

Таблица 1

Удельные скорости роста гаплоидных и диплоидных клеток штаммов S288C и XS800 при культивировании в разных питательных средах

Штамм	Среда	Удельная скорость роста, ч^{-1}
S288C	YEPD	$0,51 \pm 0,03$
	А	$0,55 \pm 0,04$
	Б	$0,55 \pm 0,05$
XS800	YEPD	$0,53 \pm 0,04$
	А	$0,51 \pm 0,03$
	Б	$0,55 \pm 0,05$

А=YEPD, приготовленная на культурной жидкости штамма XS800. Б=YEPD, приготовленная на культурной жидкости S288C.

клеток одного штамма, выращенного на культуральной жидкости другого, достоверно не различаются.

В следующих опытах культивировали смешанную популяцию дрожжей в пробирках без перемешивания с ежедневным пересевом. При пересеве суспензии разводили до $2-5 \times 10^5$ клеток/мл. Примерно за 15-18 ч концентрация клеток достигала максимального значения /1-3 $\times 10^8$ кл/мл в среде YEPD и 5-8 $\times 10^7$ кл/мл в минимальной среде/, что соответствует стационарной фазе роста культуры, и, таким образом, несколько часов перед разведением клетки находились в ранней стационарной фазе роста. Схема квазинепрерывного культивирования приведена на рис. 4 /II/. Клетки культивировали в среде YEPD, МС и БС при температурах 30°C и 40°C . Результаты приведены в табл. 2. Как видно, за 21 сут культивирования /около 200 генераций/ при росте в БС при 30°C гаплоидные клетки вытеснили диплоидные, а культивирование в МС при 30°C не выявило преимуществ какого-либо штамма: в остальных же вариантах опыта доминировал диплоид. Здесь же приведены оценки относительной конкурентоспособности K диплоидных клеток при разных условиях культивирования: в среде БС при 30°C величина K достоверно меньше нуля / $P > 0,95$ /, в сре-

Таблица 2

Совместное культивирование^а гаплоидных и диплоидных клеток штаммов S288C и XS800. Пересев клеток в свежую среду проводили через 24 ч

Среда	Температура культивирования, °C	Исходное соотношение "гаплоид: диплоид"	Соотношение "гаплоид: диплоид" через 24 сут культивирования	Относительная конкурентоспособность диплоида, К
YEPD	30	I:0	79:0	> 0,03 ^б
		0:I	0:79	
		I:I	I:79	
BC	30	I:0	79:0	-0,02 ^в
		0:I	0:79	
		I:I	74:5	
MC	30	I:0	8I:0	-0,004 ^г
		0:I	0:8I	
		I:I	54:27	
YEPD	40	I:0	79:0	> 0,03 ^б
		0:I	0:79	
		I:I	0:79	
BC	40	I:0	79:0	> 0,03 ^б
		0:I	0:79	
		I:I	0:79	

^а Режим культивирования схематично изображен на рис. 4/II/.

^б Достоверно больше 0 / P > 0,95/. ^в Достоверно меньше 0 / P > 0,95/. ^г Достоверно не отличается от 0 / α > 0,05/.

де MC при 30° C К близка к 0: во всех остальных случаях рассматриваемая величина достоверно больше 0 / P > 0,95/. Отметим, что относительная конкурентоспособность К диплоидных клеток

при культивировании в режиме I /рис. 4/ /K=0,010/ меньше, чем в режиме II /K > 0,03/. Это может означать, что в последнем случае преимущества диплоидных клеток не определяются только повышенной удельной скоростью роста, но связаны с другими причинами.

Вытеснение диплоидных клеток из смешанной популяции при культивировании в среде BC /при 30° C/ может происходить за счет разности в удельных скоростях роста /но в отличие от культивирования в среде YEPD уже в пользу гаплоидных клеток/. Исходя из наших данных, можно сделать оценку величины Δμ. Действительно, рост гаплоидных и диплоидных клеток в смешанной популяции описывается уравнениями:

$$\frac{dn_1}{dt} = \mu n_1$$

$$\frac{dn_2}{dt} = \mu n_2,$$

/3/

где n_1, n_2 - концентрации гаплоидных и диплоидных клеток соответственно. Полагая, что удельные скорости роста гаплоидов и диплоидов подчиняются уравнению Моно^{15/}, имеем:

$$\begin{cases} \frac{dn_1}{dt} = \frac{\mu_{m1} S}{K_{S1} + S} n_1, \\ \frac{dn_2}{dt} = \frac{\mu_{m2} S}{K_{S2} + S} n_2, \end{cases}$$

где μ_{m1}, μ_{m2} - максимальные удельные скорости роста гаплоидов и диплоидов, K_{S1}, K_{S2} - константы Моно, S - концентрация некоего "обобщенного" лимитирующего субстрата. Предполагая, что гаплоидный и диплоидный штаммы отличаются только по параметру μ_m , соотношение /3/ можно переписать в виде:

$$\mu_{m2} \frac{d \ln n_1}{dt} = \mu_{m1} \frac{d \ln n_2}{dt}$$

или

$$\frac{n_1^{\mu_{m2}}}{n_2^{\mu_{m1}}} = \frac{[n_1^{(0)}]^{\mu_{m2}}}{[n_2^{(0)}]^{\mu_{m2}}}, \quad /4/$$

где $n_1^{(0)}$, $n_2^{(0)}$ - исходные концентрации гаплоидных и диплоидных клеток. Учитывая, что $\mu_{m1} = \mu_{m2} + \Delta\mu$, где $\Delta\mu > 0$, получаем следующее соотношение:

$$\frac{n_2}{n_1} = \frac{n_2^{(0)}}{n_1^{(0)}} \left[\frac{n_1^{(0)}}{n_1} \right]^{\frac{\Delta\mu}{\mu_{m2}}} \quad /5/$$

Рассмотрим случай "квазинепрерывного" культивирования.

Пусть n_{1k} , n_{2k} - концентрация гаплоидных и диплоидных клеток перед $k+1$ -разведением, тогда, используя /5/, можно получить следующее соотношение:

$$\frac{n_{2k}}{n_{1k}} = \frac{n_{02}^{(0)}}{n_{01}^{(0)}} \left[\frac{n_{01}^{(0)}}{n_{01}} \cdot \frac{n_{11}^{(0)}}{n_{11}} \cdot \frac{n_{21}^{(0)}}{n_{21}} \cdot \dots \cdot \frac{n_{k1}^{(0)}}{n_{k1}} \right]^{\frac{\Delta\mu}{\mu_{m2}}}$$

Если на каждом этапе культивирования суспензию клеток разводили в L раз, а исходное соотношение клеток в смешанной культуре было 1:1, имеем:

$$\frac{n_{2k}}{n_{1k}} = \left[\frac{1}{L^k} \cdot \frac{n_{01}^{(0)}}{n_{k1}} \right]^{\frac{\Delta\mu}{\mu_{m2}}}$$

С учетом того, что с хорошей точностью можно положить $\frac{n_{01}^{(0)}}{n_{k1}} = 1/2L$, получаем:

$$\frac{\Delta\mu}{\mu_{m2}} = \frac{1}{k+1} \cdot \frac{\ln(n_{1k}/n_{2k})}{\ln L} \quad /6/$$

Здесь мы в виду малости пренебрегали слагаемым $\ln 2 = 0,7$ в знаменателе правой части /6/. Как видно из табл. 2, через 21 сут культивирования соотношение гаплоидных и диплоидных клеток в смешанной популяции при росте /при 30° С/ в среде БС составляло 74:5 в пользу гаплоида. Так как в данном случае через каждые сутки суспензию разводили примерно в 200-500 раз / $L = 200-500$ /, то исходя из соотношения /6/, получаем, что удельные скорости роста отличаются в данном случае не менее, чем на 2-3%. Из этого же соотношения легко оценить, что в случае культивирования смешанной культуры в среде БС при 40° С

удельная скорость роста диплоидных клеток может превышать соответствующую величину для гаплоидных не более, чем на 4-5%.

В других экспериментах смешанную культуру пересевали 1 раз в 2 дня, т.е. клетки находились в стационарной фазе роста около 30 ч до пересева /табл.3/. Режим культивирования представлен на рис. 4 /III/. Как видно, результаты опыта полностью аналогичны: только в одном варианте /среда БС, 30° С/ гаплоидные клетки вытесняли диплоидные из смешанной популяции, в остальных случаях преимущество имеют диплоиды.

Здесь заслуживают внимания данные, касающиеся совместного культивирования при исходном соотношении гаплоид:диплоид = 100:1. Как видно, через 26 сут культивирования /13 циклов разведения/ в среде YEPD при 30° С диплоиды практически полностью вытесняют гаплоидные клетки из смешанной популяции. Столь быстрого вытеснения нельзя было ожидать за счет определенной выше разности в удельных скоростях роста / $\Delta\mu = 0,008 \text{ ч}^{-1}$ /. Действительно, при данном исходном соотношении и указанной величине концентрации гаплоидов и диплоидов сравнялись бы через $\ln(100)/0,008 = 575$ ч роста. Для грубых оценок можно положить, что при рассматриваемом режиме культивирования /рис. 4 /III// в одном цикле разведения клетки росли около 17-18 ч, а в остальные 30-31 ч находились в стационарной фазе. Тогда концентрации гаплоидов и диплоидов должны были сравняться приблизительно через 60 сут культивирования, что находится в явном противоречии с нашими данными. Подобные же расчеты показывают, что для того, чтобы за 26 сут культивирования соотношение стало 100:1 в пользу диплоида /ситуация, близкая к нашему случаю/, величина $\Delta\mu$ должна составлять $0,04 \text{ ч}^{-1}$. Можно представить, что такая разница в скоростях роста могла быть обусловлена пониженным доступом кислорода в клетки /культивирование без аэрации/. Однако в этом случае при исходном соотношении 1:1 через 8 сут культивирования концентрация диплоидных клеток должна была бы приблизительно в 15 раз превышать соответствующую величину для гаплоидов, что противоречит экспериментальным данным.

С другой стороны, можно предположить, что скорость отмирания гаплоидных клеток выше соответствующей величины для диплоидных, что является дополнительным фактором, обуславливающим вытеснение последних из смешанной популяции при культивировании в режиме, изображенном на рис. 4 /III/. Для проверки этого предположения смешанную популяцию клеток /исходное соотношение гаплоидов и диплоидов 1:1/ инкубировали в среде YEPD при 30° С без перемешивания в течение 17 сут. Как оказалось, за указанное время инкубации соотношение жизнеспособных гаплоидных и диплоидных клеток в смешанной популяции практически не изме-

Таблица 3

Совместное культивирование^а гаплоидных и диплоидных клеток штаммов S288C и XS800. Пересев клеток в свежую среду проводили через 48 ч

Среда	Температура культивирования, °C	Исходное соотношение "гаплоид: диплоид"	Соотношение "гаплоид: диплоид" через		Относительная конкурентоспособность диплоида, К
			8 сут	26 сут	
YEPD	30	I : 0	79 : 0	79 : 0	> 0,04 ^б
		0 : I	0 : 79	0 : 79	
		I : I	37 : 42	0 : 79	
		100 : I	79 : 0	0 : 79	
BC	30	I : 0	79 : 0	79 : 0	< -0,04 ^б
		0 : I	0 : 79	0 : 79	
		I : I	74 : 5	79 : 0	
YEPD	40	I : 0	79 : 0	79 : 0	> 0,04 ^б
		0 : I	0 : 79	0 : 79	
		I : I	13 : 33	0 : 79	
		100 : I	79 : 0	0 : 79	
BC	40	I : 0	79 : 0	79 : 0	> 0,04 ^б
		0 : I	0 : 79	0 : 79	
		I : I	3 : 78	0 : 79	
		100 : I	74 : 7	0 : 79	

^а Режим культивирования схематично изображен на рис. 4 /II/.
^{б,в} См. примечания "б", "в" к табл. 2.

нилось и составило 39:41. Таким образом, различие в скоростях отмирания не может в данном случае обусловить ускоренное вытеснение гаплоидных клеток из смешанной популяции. Возможно,

Таблица 4

Совместное культивирование^а гаплоидных и диплоидных клеток штаммов S288C и XS800 в среде YEPD с периодическим воздействием гипертермического шока /45° C, 5 мин/

	Исходное соотношение "гаплоид: диплоид"	Соотношение "гаплоид: диплоид" через		Относительная конкурентоспособность диплоида, К
		12 сут	24 сут	
Контроль (без гипертермии)	I : I	I3 : 66	I : 78	0,02 ^б
Опыт	I : I	8 : 71	I : 78	0,02 ^б

^а Пересев в свежую среду проводили через 24 ч культивирования; клетки подвергали гипертермическому шоку сразу после пересева.
^б См. примечание "б" к таблице 2.

Таблица 5

Совместное культивирование^а гаплоидных и диплоидных клеток штаммов S288C и XS800 в среде YEPD при 6° C

Исходное соотношение "гаплоид: диплоид"	Соотношение "гаплоид: диплоид" через		Относительная конкурентоспособность диплоида, К
	7 недель	18 недель	
I : 0	79 : 0	79 : 0	- 0,007 ^б
I : I	48 : 9	48 : 18	
0 : I	0 : 79	0 : 79	

^а Пересев в свежую среду проводили 1 раз в неделю. ^б Достоверно не отличается от 0 / $\alpha > 0,05$ /.

это обусловлено различиями в продолжительности лаг-фазы у двух изучаемых штаммов, или другими причинами. Не исключено, например, что вытеснение гаплоидов диплоидами при данном режиме вообще не является равномерным процессом, т.е. скорость вытеснения одного штамма другим может изменяться в ходе культивирования.

Кратковременный гипертермический шок /45° С, 5 мин/ не влияет на доминирование диплоидных клеток в смешанной популяции /табл. 4/ при культивировании в богатой среде.

В следующем опыте смешанную популяцию культивировали при 6° С /табл. 5/. Удельные скорости роста гаплоидных и диплоидных клеток в среде YEPD при данной температуре составляют около 0,06 ч⁻¹. Клетки пересевали в свежую среду 1 раз в неделю. Как видно, в течение около 200 генераций не выявилось преимущество какого-либо из штаммов: величина К диплоидных клеток в этом случае достоверно не отличается от 0.

Итак, здесь продемонстрировано, что относительная конкурентоспособность гаплоидных и диплоидных клеток может изменяться в разных условиях культивирования.

Можно представить, что в ходе биологической эволюции закрепление диплоидной фазы произошло именно в тех условиях внешней среды, когда образовавшаяся диплоидная клетка имела селективные преимущества перед гаплоидной популяцией. Дальнейшее эволюционное развитие диплоидных организмов привело к реализации известных преимуществ диплоидов /большая изменчивость, способность маскировать вредные мутации и т.п./, в результате чего произошло практически полное вытеснение гаплоидов среди эукариот. С другой стороны, как указывали, основываясь на собственных результатах, Адамс и Ханше^{8/}, в условиях конкуренции за субстрат диплоидные клетки, по-видимому, не имели шансов вытеснить гаплоидные популяции /в пользу этого предположения свидетельствуют также и наши данные по совместному культивированию гаплоидов и диплоидов в обедненной среде, см. табл. 2, 3/, что позволило гаплоидным организмам, например, дрожжам-гаплонтам, сохраниться в ходе эволюции.

В следующих опытах мы поставили перед собой задачу определить относительную конкурентоспособность гаплоидных и диплоидных клеток при культивировании в осмотически плотных средах, в частности, в средах, содержащих повышенные концентрации хлористого калия. Ранее было показано^{1/}, что хлористый калий, добавленный в жидкую питательную среду /1,5 М/, уменьшает эффективность γ -индуцированной митотической рекомбинации у диплоидных клеток *S. cerevisiae*. Способность диплоидных клеток к рекомбинации - возможно, одна из причин адаптивной значимости диплоидной фазы. В связи с этим было интересно сравнить

Таблица 6
Совместное культивирование^а гаплоидных и диплоидных клеток штаммов S288C и XS800 в разных средах при 30°С

Среда	Исходное соотношение "га-плоид: диплоид"	Соотношение "гаплоид:диплоид"					Относительная конкурентоспособность диплоида, К
		Время культивирования, сут					
		8	14	22	28	36	
YEPD	I:0	79:0	74:0	79:0	79:0	79:0	> 0,03 ^б
	0:I	0:50	0:79	0:79	0:79	0:79	
	I:I	46:23	16:55	7:60	0:54	0:58	
	100:I	46:0	64:15	40:17	-	0:79	
YEPD + I,5 M KCl	I:0	79:0	73:0	50:0	79:0	79:0	-0,02 ± 0,02 ^в
	0:I	0:79	0:64	0:62	0:79	0:79	
	I:I	57:16	18:47	65:3	52:29	75:6	
	100:I	54:1	62:7	55:1	58:3	42:0	
YEPD + I,5 M сорби-тол	I:0	50:0	79:0	79:0	79:0	79:0	> 0,03 ^б
	0:I	0:33	0:79	0:56	0:79	0:79	
	I:I	11:18	7:17	2:56	0:79	0:79	
	100:I	17:0	28:2	23:16	-	0:79	

^а Клетки пересевали в свежую среду 1 раз в 2 сут. ^{б,в} См. примечания "б" и "в" к таблице 2.

конкурентоспособность гаплоидов и диплоидов в условиях пониженной рекомбинационной способности. Предварительно было установлено, что штаммы дрожжей S288C и XS800 растут в жидкой среде YEPD + 12% KCl примерно с одинаковой удельной скоростью роста $\mu = 0,23 - 0,24$ ч⁻¹ после двухсуточной адаптации к повышенным концентрациям KCl. Результаты опытов представлены в табл. 6. Параллельно смешанную культуру выращивали в средах YEPD и

YEPD + 1,5 М сорбитол. Сорбитол в концентрации 1,5 М, как установлено нами, не влияет на митотическую рекомбинацию диплоидных дрожжей /данные не приведены/. Как видно, через 28 сут культивирования в среде YEPD и YEPD + 1,5 М сорбитол полностью вытесняют гаплоидные, в то время как в среде с КС₂ к этому сроку соотношение гаплоид:диплоид составляет 52:29 в пользу гаплоида, а через 35 сут культивирования - 75:6 /К достоверно не отличается от 0/. Таким образом, в условиях пониженной рекомбинационной способности клеток /в присутствии КС₂/ диплоидные клетки не вытесняют гаплоидных, как в случае культивирования в средах YEPD и YEPD с сорбитолом. Не исключено, конечно, что КС₂ снижает относительную конкурентоспособность диплоидов не посредством подавления у них рекомбинации, а по другим механизмам. Тем не менее, полученные данные можно рассматривать как косвенное указание на роль рекомбинации как процесса, обуславливающего селективное преимущество диплоидных дрожжей при совместном культивировании в богатой среде с гаплоидами.

В следующей серии опытов изучали рост смешанной культуры гаплоидных и диплоидных клеток *Pichia pinus*. Дрожжи *P. pinus* интересны тем, что являются природными гаплонтами, т.е. в природе встречаются в гаплоидном состоянии /в отличие от *S. cerevisiae*, природных диплоидов/. Диплоиды *P. pinus*, полученные искусственным путем, спорулируют в стационарной фазе роста культуры или в бедной среде⁷⁷. "Квазинепрерывное" культивирование диплоидных клеток *P. pinus* в минимальной среде приводит к быстрому появлению в популяции гаплоидов /в результате споруляции/ и вытеснению исходной культуры. В связи с этим мы использовали диплоидный штамм, гетерозиготный по генам пути биосинтеза аденина ADE1, ADE2, ADE4, ADE7 /см. р. "Материалы и методы"/. При культивировании такого штамма в минимальной среде без аденина не происходит его вырождения в гаплоид, так как в результате споруляции образуются гаплоидные споры, ауксотрофные по аденину. Предварительные опыты показали, что удельные скорости роста используемых гаплоидного /МН4/ и диплоидного /190 x 356/ штаммов составляют $0,40 \pm 0,05$ и $0,37 \pm 0,05$ ч⁻¹ /P > 0,95/ и не различаются в пределах ошибки измерений. Культивирование проводили в колбах с аэрацией в режиме, схематично изображенном на рис. 4 /1/. Как видно, совместное культивирование указанных штаммов в минимальной среде привело к вытеснению /в течение приблизительно 150-200 генераций/ диплоидного штамма из смешанной популяции /табл. 7/. Таким образом, у дрожжей - природных гаплонтов при использованном режиме культивирования гаплоидные клетки имеют селективные преимущества перед диплоидными. Заметим, что при культивировании в

Таблица 7

Совместное культивирование^a гаплоидных /МН4/ и диплоидных /190 x 356/ клеток *P. pinus* в минимальной среде при 30° С

Исходное соотношение "гаплоид: диплоид"	Соотношение "гаплоид:диплоид:			Относительная конкурентоспособность диплоида, К
	Время культивирования, сут			
	10	28	43	
I:0	223:0	187:0	194:0	- 0,01 ^b
0:I	0:181	0:215	0:167	
I:I	84:18	115:0	90:3	

^a Режим культивирования схематично изображен на рис. 4 /1/.

^b Достоверно меньше 0 /P > 0,95/.

МС дрожжей *S. cerevisiae* в течение около 200 генераций не выявилось преимуществ гаплоидного или диплоидного штамма /табл. 1/.

В заключение отметим основной вывод работы. При разных режимах культивирования имеет место разная относительная конкурентоспособность гаплоидных и диплоидных клеток *S. cerevisiae*: так, диплоиды могут иметь положительную, отрицательную и нулевую конкурентоспособность при росте в смешанной популяции с гаплоидными клетками. Механизмы, обуславливающие разную конкурентоспособность гаплоидов и диплоидов при росте в смешанной популяции, не ясны, и требуют дальнейшего изучения. Однако тот факт, что существуют условия, в которых диплоиды имеют селективные преимущества, по-видимому, свидетельствуют не в пользу выдвигаемой авторами^{10/} гипотезы о том, что диплоид есть просто удвоенный гаплоид, что приводит, по их мнению, к повышенной скорости адаптивных мутаций в диплоидной популяции по сравнению с гаплоидной. Вероятно, в некоторых условиях сам по себе переход в диплоидное состояние может дать селективные преимущества диплоидизировавшимся клеткам, что могло способствовать закреплению диплоидной фазы в ходе биологической эволюции.

Выражаем благодарность профессору В.И.Корогодину за обсуждение результатов данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глазунов А.В., Борейко А.В., Эссер А.Х. - Генетика, 1988, т.24, №3, с.428.
2. Егорова В.И., Горденин Д.А., Гришин А.В. - Генетика, 1981, т.17, №4, с.628.
3. Карпова Т.С., Горденин Д.А., Андрианова В.А. - Генетика, 1983, т.19, №12, с.1934.
4. Левитский Г.А. Цитогенетика растений. М.: Наука, 1978.
5. Перт Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М.: Мир, 1978.
6. Репневская М.В., Инге-Вечтомов С.Г. - Молекулярная биология, 1986, т.20, вып.56, с.1176.
7. Толсторуков И.И. и др. - Генетика, 1977, т.13, №2, с.322.
8. Adams J., Hanche P.E. - Genetics, 1974, v.76, p.327.
9. Lewontin R.G. Basis of Evolutionary Change. Columbia University Press, 1974.
10. Maynard S.J. The Evolution of Sex. Cambridge University Press, 1978.
11. Paquin C., Adams J. - Nature, 1983, v.302, p.495.

Рукопись поступила в издательский отдел
9 сентября 1988 года.

ТЕМАТИЧЕСКИЕ КАТЕГОРИИ ПУБЛИКАЦИЙ ОБЪЕДИНЕННОГО ИНСТИТУТА ЯДЕРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Индекс	Тематика
1.	Экспериментальная физика высоких энергий
2.	Теоретическая физика высоких энергий
3.	Экспериментальная нейтронная физика
4.	Теоретическая физика низких энергий
5.	Математика
6.	Ядерная спектроскопия и радиохимия
7.	Физика тяжелых ионов
8.	Криогеника
9.	Ускорители
10.	Автоматизация обработки экспериментальных данных
11.	Вычислительная математика и техника
12.	Химия
13.	Техника физического эксперимента
14.	Исследования твердых тел и жидкостей ядерными методами
15.	Экспериментальная физика ядерных реакций при низких энергиях
16.	Дозиметрия и физика защиты
17.	Теория конденсированного состояния
18.	Использование результатов и методов фундаментальных физических исследований в смежных областях науки и техники
19.	Биофизика