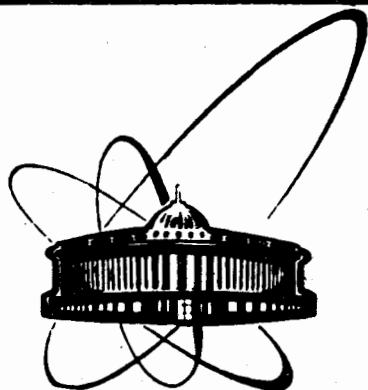


90-43



т
ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

Н 203

P19-90-43

Х.Найдхардт, А.В.Глазунов

КОНКУРЕНЦИЯ ИЗОГЕННЫХ ГАПЛОИДНЫХ
И ДИПЛОИДНЫХ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE И *PICNIA PINUS* ПРИ РОСТЕ
В СМЕШАННЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ

Направлено в журнал "Микробиология"

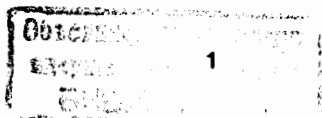
1990

Изучение конкурентоспособности гаплоидных и диплоидных дрожжевых клеток при росте в смешанной популяции, на наш взгляд, может оказаться полезным для выяснения роли пloidности в эволюции эукариот. Ранее было показано, что при росте в хемостате гаплоидные и диплоидные клетки *S.cerevisiae* не отличаются по такому важному параметру, как максимальная удельная скорость роста [1].

С другой стороны, при длительных пересевах в музее петергофской коллекции дрожжей без контроля пloidности большинство из проверенных (около 70%) культур "самодиплоидизировались", что позволяет предположить селективные преимущества автодиплоидов перед гаплоидными клетками [2]. В нашей опубликованной недавно работе [3] была изучена относительная конкурентоспособность гаплоидных и диплоидных клеток *S.cerevisiae* при культивировании в режиме "квазинепрерывного" культивирования дрожжей: клеточные суспензии периодически разбавляли свежей средой в течение длительного времени, при этом измеряли соотношение гаплоидов и диплоидов в смешанной популяции. Оказалось, что при разных режимах культивирования диплоиды имеют разную конкурентоспособность в сравнении с гаплоидами, т.е. в одних случаях могут вытеснять гаплоиды из смешанной популяции, в других случаях, напротив, преимущество имеют гаплоидные клетки. В данной работе основное внимание уделено дрожжевым клеткам *Pichia pinus* - природным гаплонтам, в отличие от *S.cerevisiae*, природных диплоидов. Диплоидные клетки *P.pinus* получены искусственным путем и не являются стабильными. В связи с этим было интересно попытаться выявить условия культивирования, при которых диплоиды превосходят по конкурентоспособности гаплоидные клетки.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы дрожжей *S.cerevisiae* дикого типа гаплоидный 2873-1А и изогенный ему диплоидный 2873-1В. Штаммы изогенны по всем генам, за исключением локуса типа спаривания [4,5]. Кроме того, использованы изогенные гаплоидные и диплоидный штаммы дрожжей *P.pinus* МН4 (дикий тип) и МН4Д, а также диплоидный штамм 190x356 (ade1ade4/ade2ade7). Штаммы получены от И.И.Толсторукова и С.Г. Беневоленского (ВНИИгенетика, Москва).



Клетки культивировали в колбах с аэрацией в богатой среде YEPD (пептон 10г/л, дрожжевой экстракт 5г/л, глюкоза 20г/л) или в минимальной среде МС (KH_2PO_4 1г/л, MgSO_4 0.5г/л, NaCl 0.1г/л, CaCl_2 0.1г/л, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.5г/л, глюкоза 20г/л, витамины, микроэлементы).

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, после чего 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⁺SSA1*), гиперчувствительного к α -фактору [6]. Гаплоидные клетки α -типа спаривания образуют колонии, вокруг которых имеется "ореол"-участок, где отсутствует рост клеток тестерного штамма, тогда как вокруг колоний клеток 2873-1В такого "ореола" не образуется. Частота спонтанного переключения локуса типа спаривания у гетероталлических дрожжей составляет 10^{-6} [7], поэтому приведенным выше способом можно надежно отличить гаплоид от диплоида в используемой системе.

Для определения плоидности дрожжей *P.FINUS* клетки клонировали на среде Rg (пептон 0.2г/л, дрожжевой экстракт 0.2г/л, глюкоза 1г/л, агар-агар 20г/л) [8]. 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

Для сравнения закономерностей роста смешанных популяций гаплоидов и диплоидов *P.FINUS* и *S.CEREVISIAE* в данной работе использовали изогенные гомоталлические дрожжи *S.CEREVISIAE*, описанные Г.И. Наумовым и И.И. Толсторуковым [4,5]; изогенность штаммов дрожжей-сахарометов обеспечена тем, что гаплоид и диплоид являются потомками одной гаплоидной аскоспоры. Аналогичными причинами обусловлена также изогенность гаплоидов и диплоидов *P.FINUS*.

На рис.1 приведены кривые роста гаплоидных и диплоидных клеток *S.CEREVISIAE* штаммов 2873-1А и 2873-1В в богатой среде YEPD и в минимальной среде МС. Удельные скорости роста в среде YEPD для гаплоидных и диплоидных клеток не различаются в пределах ошибки измерения и составляют 0.57 ± 0.04 и $0.50 \pm 0.04 \text{ ч}^{-1}$ ($P = 0.95$) соответственно. В минимальной среде МС соответствующие значения скоростей роста гаплоидов и диплоидов составляют 0.32 ± 0.02 и $0.30 \pm 0.02 \text{ ч}^{-1}$ ($P = 0.95$) и, следовательно, также не различаются в пределах ошибки измерения.

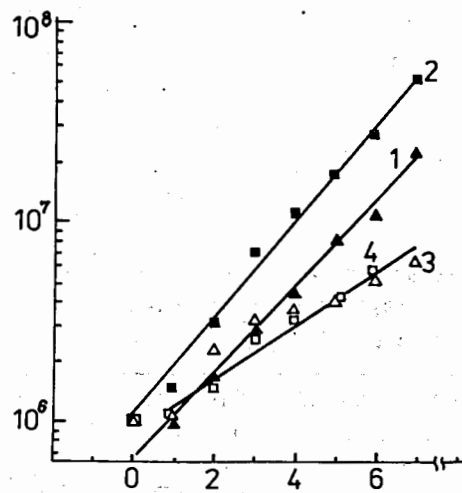


Рис.1. Кривые роста гаплоидных (1,3) и диплоидных (2,4) клеток *S.CEREVISIAE* штаммов 2873-1А и 2873-1В в богатой среде YEPD (1,2) и минимальной среде МС (3,4) при 30°C. По оси абсцисс - время, час; по оси ординат - концентрация клеток, мл⁻¹.

На рис.2 приведены кривые роста в среде МС гаплоидных (МН4) и диплоидных (МН4Д и 190х356) штаммов *P.FINUS*. Как видно, в данном случае удельные скорости роста гаплоидов и диплоидов также не различаются в пределах ошибки измерения, которые составляют, соответственно: 0.40 ± 0.04 ; 0.39 ± 0.03 ; $0.37 \pm 0.03 \text{ ч}^{-1}$.

В таблице 1 приведены данные типичного опыта (каждый опыт, приведенный ниже, повторяли не менее 3 раз) по культивированию гаплоидных (2873-1А) и диплоидных (2873-1В) клеток *S.CEREVISIAE* в смешанной популяции при экспоненциальном росте в среде при 30°C.

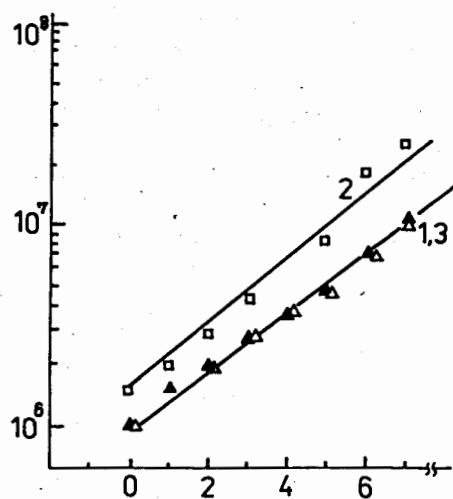


Рис. 2. Кривые роста гаплоидных (1) и диплоидных клеток *P. pinus* (2,3) штаммов МН4 (1), МН4Д (2) и 190 x 356 (3) в минимальной среде МС при 30°C. Обозначения те же, что и на рис.1.

Таблица 1. Совместное культивирование гаплоидных и диплоидных клеток *S. cerevisiae* штаммов 2873-1А и 2873-1В в разных средах при 30°C

Среда	Соотношение "гаплоид : диплоид"					Относительная конкурентоспособность диплоида, К
	Время культивирования, сут.					
	0	2	5	7	8	
YEFD	36:35	7:73	0:69	0:80	-	0.06±0.02 ^А
МС	42:62	20:60	8:63	3:77	1:77	0.08±0.03 ^А

^А К достоверно больше 0 ($\alpha < 0.05$).

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 $1 \cdot 10^2$ клеток/мл

средой YEFD и до концентрации $1 \cdot 10^4$ клеток/мл средой МС; через сутки культивирования концентрация клеток в обоих случаях составляла $3-6 \cdot 10^6$ клеток/мл, что соответствует экспоненциальному участку кривой роста для обоих штаммов. Лаг-фаза при пересеве клеток в свежую среду составляла не более 1 ч. Как видно, через 5 сут. роста (около 70 генераций) в среде YEFD и 8 сут. роста (около 40 генераций) в среде МС в популяции практически не остается гаплоидных клеток. Ранее нами был получен аналогичный результат для другой пары гаплоидов и диплоидов *S. cerevisiae* [3], однако в том случае вытеснение гаплоидов из смешанной популяции при росте в богатой среде происходило за более длительный срок (около 300 генераций). Существенным, на наш взгляд, здесь является то, что в настоящей работе использованы полностью изогенные штаммы гаплоидов и диплоидов *S. cerevisiae* и можно быть уверенным, что повышенная конкурентоспособность диплоидов связана именно с двойным набором хромосом. Как было показано в цитируемой работе, разность в удельных скоростях роста гаплоидных и диплоидных клеток, если исходное соотношение гаплоидов и диплоидов в смешанной популяции составляло 1:1, можно оценить из следующего соотношения:

$$\Delta \mu = \frac{1}{T} \ln \left(\frac{C_2}{C_1} \right), \quad (1)$$

где T — время квазинепрерывного культивирования, ч; C_1 , C_2 — концентрация гаплоидов и диплоидов в смешанной популяции после культивирования в течение времени T .

В опыте, представленном в таблице 1, $\Delta \mu$ составляет $0.03 \pm 0.01 \text{ ч}^{-1}$ ($P = 0.95$) в случае роста в богатой среде и $0.02 \pm 0.01 \text{ ч}^{-1}$ ($P = 0.95$) при росте в минимальной среде.

Вне зависимости от механизма вытеснения одного штамма другим следующая величина определена в работе [3] как относительная конкурентоспособность штамма 1 при совместном культивировании со штаммом 2, когда исходные концентрации клеток составляют 1:1

$$K = \frac{T}{t} \ln \left(\frac{C_1}{C_2} \right), \quad (2)$$

где t — время генерации смешанной популяции. В опыте, представленном в таблице 1, относительная конкурентоспособность K диплоида при культивировании в богатой и минимальной среде составляет $0.06 \pm$

0.02 и 0.08 ± 0.03 соответственно и достоверно больше 0 ($\alpha < 0.05$). 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 среде [7]. "Квазинепрерывное" культивирование диплоидных клеток *P. pinus* в минимальной среде приводит к быстрому появлению в популяции гаплоидов (в результате споруляции - если культуру не поддерживать строго в середине экспоненциальной фазы роста) и вытеснению исходной культуры. В связи с этим мы использовали диплоидный штамм, гетерозиготный по генам пути биосинтеза аденина ADE1, ADE2, ADE4, ADE7 (см. "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 ± 0.05 и 0.37 ± 0.05 ч⁻¹ ($P = 0.95$) и не различаются в пределах ошибки измерений. Культивирование проводили в колбах с аэрацией с ежедневным пересевом так, чтобы культура находилась в экспоненциальной фазе роста.

Совместное культивирование указанных штаммов в минимальной (таблица 2) среде привело к быстрому вытеснению (в течение 50 генераций) диплоидного штамма из смешанной популяции: через 5 сут. культивирования соотношение гаплоидов и диплоидов в популяции составляло 293:0 в пользу гаплоида (при исходном соотношении 4:1 в пользу гаплоида). Относительная конкурентоспособность диплоида К в данном случае составляет <-0.1 и достоверно меньше 0 ($\alpha < 0.05$). Эти результаты совпадают с полученными нами ранее [3] в аналогичных опытах.

Здесь мы предположили, что повышенная конкурентоспособность гаплоидного штамма может быть связана с эффектом дозы гена (диплоид, как указано выше, является гетерозиготным по генам пути биосинтеза аденина). Для проверки этого предположения мы в опыте, параллельном описанному выше, провели культивирование гаплоидов и диплоидов *P. pinus* в минимальной среде с добавлением 1 мг/л аденина.

Данная концентрация аденина позволяет ауксотрофным гаплоидам, образовавшимся при споруляции диплоидных клеток, поделиться лишь несколько раз, и поэтому такие гаплоидные клетки не способны конкурировать с диплоидами при росте в смешанной популяции. Оказалось (таблица 2), что в указанных условиях культивирования преимущество имеет диплоидный штамм. Относительная конкурентоспособность диплоидных клеток в данном опыте составляет 0.018 ± 0.006 и достоверно больше 0 ($\alpha < 0.05$).

Таблица 2. Совместное культивирование гаплоидных и диплоидных клеток *P. pinus* штаммов МН4 и 190 x 356 в разных средах при 30°C

Среда	Соотношение "гаплоид : диплоид"						Относительная конкурентоспособность диплоида, К
	Время культивирования, сут.						
	0	5	7	11	16	20	
MC	160:0	79:0	155:0	-	-	-	
MC	0:78	0:38	0:74	-	-	-	
MC	400:116	293:0	56:0	456:0	170:0	-	$<-0.1^A$
MC + ADE ⁰	123:0	93:0	98:0	-	-	-	
	0:161	0:94	0:64	-	-	-	
	283:163	106:25	64:72	50:296	19:358	0:88	$0.018^B \pm 0.006$

^A К достоверно меньше 0 ($\alpha < 0.05$).

⁰ В минимальную среду добавлен 1 мг/л аденина.

^B К достоверно больше 0 ($\alpha < 0.05$).

Таким образом, искусственно полученный диплоид из природных гаплонтов *P. pinus* в данных условиях имеет селективные преимущества при росте в минимальной среде.

Заметим, однако, что использованные здесь гаплоидные и диплоидные клетки не являются полностью изогенными, так как диплоид гетерозиготен по 4 генам аденинового синтеза, при этом не исключена гетерозиготность и по ряду других генов. Следовательно, сама по

себе диплоидность здесь, возможно, не есть причина повышенной конкурентоспособности диплоидного штамма.

В связи с этим мы сконструировали диплоидный штамм МН4Д, скрестив гаплоид "сам на себя", после чего сразу использовали полученную изогенную пару штаммов разной плоидности в опытах по культивированию в смешанной популяции. Мы культивировали гаплоид диплоид и смешанную популяцию *P. pinus* в среде МС, строго поддерживая клетки в экспоненциальной фазе роста (как указывалось выше, в стационарной фазе роста культуры диплоид спорулирует). Результаты типичного опыта представлены в таблице 3. Как видно, при культивировании диплоида образуется незначительная доля гаплоидных клеток (по-видимому, в результате споруляции), однако эта доля (5-10%) остается примерно постоянной на протяжении всего периода культивирования (130 генераций). За все время культивирования гаплоидных клеток появление диплоидов в популяции не отмечено.

Таблица 3. Совместное культивирование гаплоидных и диплоидных клеток *P. pinus* штаммов МН4 и МН4Д в среде МС при 30°C

Соотношение "гаплоид : диплоид"								
Время культивирования, сут.								
0	1	7	10	13	17	19	26	
254:0	203:0	-	178:0	-	-	-	-	
53:541	14:161	-	9:195	4:185	-	-	-	
161:172	93:125	43:55	23:47	77:161	152:317	100:307	18:108	

В смешанной же популяции с увеличением времени культивирования доля диплоидов медленно возрастает, достигая 85% после 260 генераций. Значительная часть (если не все) гаплоидов в смешанной популяции через 260 генераций, по-видимому, образовалась за счет споруляции диплоида. Если этот канал образования гаплоидов заблокировать путем конструирования диплоида специального генотипа (см. выше), то диплоид быстро вытесняет гаплоидные клетки из смешанной популяции.

Таким образом, совокупность представленных данных позволяет сделать вывод о положительной конкурентоспособности диплоидов *P. pinus* при культивировании в смешанной с гаплоидными клетками популяции.

Полученные результаты, на наш взгляд, представляют интерес в связи с проблемой закрепления диплоидной фазы в ходе эволюционного развития. Очевидно, что случайно диплоидизировавшаяся клетка может закрепиться в популяции гаплоидов лишь в том случае, если имеет перед последними селективные преимущества. В этом смысле опыты с дрожжевыми клетками *S. cerevisiae* имеют ограниченное значение, поскольку в природе эти организмы встречаются в диплоидном состоянии и наблюдаемые рядом исследователей ([2,3] и настоящая работа) селективные преимущества диплоидных клеток по сравнению с гаплоидными могли быть результатом поздних генетических изменений в уже сформировавшихся диплоидах. Поэтому представляется важным, что для дрожжей *P. pinus*, встречающихся в природе в гаплоидном состоянии, существуют условия культивирования, при которых диплоид имеет селективные преимущества перед гаплоидами. Интересно, что авторам работы [9] удалось в течение длительного времени поддерживать смешанную культуру гаплоидов и диплоидов *P. pinus* в хемостате с использованием метанола в качестве основного источника углерода. Таким образом, есть основания полагать, что в использованном авторами режиме культивирования относительная конкурентоспособность диплоидов в смешанной с гаплоидами популяции близка к 0. Это обстоятельство также свидетельствует в пользу высокой конкурентоспособности диплоидных клеток данного вида при росте в смешанной с гаплоидами популяции.

Выражаем благодарность профессору В.И.Корогодину за обсуждение результатов данной работы и И.И.Толсторукову и С.Г. Беневоленскому за предоставление штаммов дрожжей.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] ADAMS J., HANSCHKE P.E. POPULATION STUDIES IN MICROORGANISMS I. EVOLUTION OF DIPLOIDY IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE. //GENETICS. -1974-VOL.76.-N2.-P.327-338.
- [2] Карпова Т.С., Горденин Д.А., Андрианова В.А., Инге-Вечтомов С.Г. Генетический экспресс-тест для различения гаплоидов и автодиплоидов у дрожжей-сахаромицетов. //Генетика-1983. -Т.19.-N12. -С.1934-1939.
- [3] Глазунов А.В., Борейко А.В., Эссер А.Х. Относительная конкурентоспособность гаплоидных и диплоидных дрожжей при росте в смешанных популяциях.//Препринт ОИЯИ. Р19-88-672. Дубна 1988. 18 с.
- [4] Наумов Г.И., Толсторуков И.И. Сравнительная генетика дрожжей. Сообщение 8. Генетика гомоталлизма дрожжей SACCHAROMYCES CEREVISIAE VAR. ELLIPSOIDEUS 28-73.//Генетика. -1972.-Т.8.-N1- С. 95-100.
- [5] Наумов Г.И., Толсторуков И.И. Обнаружение нестабильного гомоталлического штамма дрожжей SACCHAROMYCES CEREVISIAE VAR. ELLIPSOIDEUS.// Биологические науки.-1971.-N10.-С.92-94.
- [6] Егорова В.И., Горденин Д.А., Гришин А.В. Генетический анализ барьерного эффекта у дрожжей-сахаромицетов.//Генетика.-1981.-Т.17.-N4.-С.628-635.
- [7] Репневская М.В., Инге-Вечтомов С.Г. Структура и функции локуса, определяющего тип спаривания у дрожжей-сахаромицетов.//Молекулярная биология.-1986.-Т.20.-N5.-С.1176-1191.
- [8] Толсторуков И.И., Дутова Т.А., Беневоленский С.В., Соом Я.О. Гибридизация и генетический анализ метанолюкисляющих дрожжей Pichia pinus.//Генетика.-1977.-Т.8.-N2.- С.322-329.
- [9] Паршина С.Н., Виханский Ю.Д., Капутьцевич Ю.Г., Толсторуков И.И. Рост на метаноле гаплоидных и диплоидных дрожжей Pichia pinus. //Микробиология.-1983.-Т.52.-Вып.4.-С.668-671.

Рукопись поступила в издательский отдел
24 января 1990 года.