

Г. И. Наумов

ДИВЕРГЕНЦИЯ И КЛАССИФИКАЦИЯ ВИДОВ ДРОЖЖЕЙ

G. I. NAUMOV. DIVERGENCE AND CLASSIFICATION OF YEAST SPECIES

Изучение фертильности гибридов естественных штаммов дрожжей, а также молекулярная гибридизация их ДНК позволяет говорить о четкой дискретности генофонда родов. Роды дрожжей представлены биологическими видами, не имеющими между собой свободного генетического обмена и резко различающимися по ДНК. Для штаммов одного вида характерна фертильность гибридов и высокая гомология ДНК.

Род *Saccharomyces*

Данные геносистематики говорят о родстве двух видов сахаромикетов: *Saccharomyces cerevisiae* и *S. terrestris*. К биологическому виду *S. cerevisiae* относятся штаммы, различающиеся по способностям утилизировать сахара, но имеющие общий генофонд. Природные штаммы этого вида независимо от географического и экологического распространения способны скрещиваться и давать плодовитое потомство (Наумов, 1979). Следует иметь в виду, что выживаемость полового потомства гибридов может быть низкой из-за аналогичного свойства родителей. Естественные и производственные штаммы сахаромикетов часто обладают пониженной выживаемостью аскоспор. Это может быть следствием нечетной полиплоидии, анеуплоидии, наличия рецессивных леталей и полумлеталей, делеций, инверсий. Путем инбридинга, или самодиплоидизации, удается повысить выживаемость аскоспор. Очевидно, что в опытах по выяснению наличия генетических механизмов изоляции родительские штаммы должны быть представлены моноспоровыми культурами с высокой выживаемостью спор.

С использованием высокофертильных моноспоровых клонов нам удалось показать отсутствие генетической изоляции у штаммов *S. cerevisiae* различного происхождения (Наумов, 1979). Выживаемость аскоспор гибридов гомоталлических штаммов обычно достигает 80—90%. В скрещиваниях с участием гетероталлических штаммов выживаемость несколько ниже — 50—70%. Принадлежность различных природных штаммов *S. cerevisiae* к одному биологическому виду подтверждается изучением их ДНК (Yarrow, Nakase, 1975). Опыты по молекулярной гибридизации ДНК показали высокую гомологию геномов — 89—96% (Bicknell, Douglas, 1970).

Недавно нами было доказано существование нового биологического вида *S. terrestris*. Этот вид является двойником *S. cerevisiae*. При скрещивании 7 почвенных штаммов *S. terrestris* (Jensen, 1967) и 6 штаммов *S. cerevisiae* установлено, что зиготы образовывались как во внутривидовых, так и в межвидовых скрещиваниях. Гибриды обильно спорулировали, но в отличие от внутривидовых гибридов *S. terrestris* все межвидовые гибриды формировали нежизнеспособные аскоспоры.

Род *Kluyveromyces*

Возможность скрещивания различных видов рода *Kluyveromyces* показана многими авторами. В табл. 1 приведен список полученных гибридов *Kluyveromyces* и гомология их ДНК (Bicknell, Douglas, 1970; Martini, 1973). Прежде всего отметим, что различные штаммы одного вида имеют высокую гомологию ДНК (*K. lactis*, *K. fragilis*). В связи с высокой гомологией ДНК некоторых *Kluyveromyces* произведено укрупнение видов. *K. fragilis* отнесен к *K. marxianus*, *K. vanudenii* — к *K. lactis*, *K. wikenii* и *K. cicerisporus* — к *K. bulgaricus*. Таксономическое положение видов *K. drosophilae* и *K. phaseolusporus* не вполне ясно, поскольку их ДНК

Гибридизация дрожжей рода *Kluyveromyces* и гомология их ДНК (в %)

Гибрид	Гомология	
	Bicknell, Douglas (1970)	Martini (1973)
<i>K. marxianus</i> × <i>K. fragilis</i>	93	97
(<i>K. fragilis</i> × <i>K. fragilis</i>)	91	
<i>K. lactis</i> × <i>K. lactis</i>	96	
<i>K. vanudenii</i> × <i>K. lactis</i>		97
<i>K. wikenii</i> × <i>K. cicerisporus</i>		103
(<i>K. wikenii</i> × <i>K. bulgaricus</i>)		120
<i>K. cicerisporus</i> × <i>K. bulgaricus</i>		117
<i>K. drosophilum</i> × <i>K. phaseolosporus</i>		70
<i>K. fragilis</i> × <i>K. lactis</i>	7, 5, 6, 22	16
<i>K. marxianus</i> × <i>K. lactis</i>	9	12
<i>K. dobzhanskii</i> × <i>K. lactis</i>	32	4
<i>K. dobzhanskii</i> × <i>K. fragilis</i>	27	14
<i>K. aestuarii</i> × <i>K. lactis</i>		32
(<i>K. aestuarii</i> × <i>K. vanudenii</i>)		36
<i>K. aestuarii</i> × <i>K. wikenii</i>		
(<i>K. cicerisporus</i> × <i>K. aestuarii</i>)		32
<i>K. wickerhamii</i> × <i>K. drosophilum</i>		
<i>K. wickerhamii</i> × <i>K. vanudenii</i>		
(<i>K. wickerhamii</i> × <i>K. lactis</i>)		6
<i>K. drosophilum</i> × <i>K. marxianus</i>		27
<i>K. dobzhanskii</i> × <i>K. phaseolosporus</i>		35
<i>K. lactis</i> × <i>K. cicerisporus</i>		12
<i>K. lactis</i> × <i>K. wikenii</i>		16
<i>K. vanudenii</i> × <i>K. wikenii</i>		3

Примечание. В скобках приводятся комбинации, у которых скрещивание не изучалось.

гомологична на 70%. Приведенные данные показывают, что для штаммов одного вида характерна высокая гомология ДНК (~100%), для штаммов различных видов — 3—36%. Большая часть гибридов была получена массовыми скрещиваниями спор, маркированными питательными потребностями во время 4 пересевов с интервалом 7 суток (Johannsen, van der Walt, 1978; van der Walt, Johannsen, 1979). Прототрофные гибриды отбирали на селективных средах. Авторы, производившие гибридизацию, считают, что все скрещивающиеся штаммы *Kluyveromyces* следует отнести к одному виду. На наш взгляд, в цитируемых работах факты наличия прототрофных клеток и выживаемости аскоспор не дают объективную количественную оценку рекомбинации. Выделенные прототрофы могли иметь совершенно различное происхождение. В частности, они могут быть гибридами первичного скрещивания родительских спор, сложных сестринских или возвратных скрещиваний, а также моноспоровыми культурами от всех этих скрещиваний. На частоту встречаемости прототрофов наложила отпечаток селекция в процессе пересевов. Следует ожидать, что в процессе пересевов и имело место повышение выживаемости аскоспор гибридного происхождения за счет отбора жизнеспособных спор, возвратных скрещиваний, инбридинга и самодиплоидизации. Для правильного установления и оценки генетического обмена у различных *Kluyveromyces* необходимо размножить гибрид вегетативно, не допуская аскоспорообразования, затем провести анализ продуктов контролируемого мейоза, включая определение выживаемости спор и частоты встречаемости всех классов рекомбинантов. На основе данных по низкой гомологии ДНК, а также современных знаний генетических процессов можно априорно утверждать, что выживаемость полового потомства исходных гибридов *Kluyveromyces* очень низка, а возможность генетического обмена очень ограничена. Следует считать неправильным отнесение всех *Kluyveromyces* к одному виду.

Наиболее целенаправленно гибридизацию использовали в видовой классификации дрожжей рода *Metschnikowia*. Видовая классификация стала разрабатываться особенно успешно с обнаружением гетероталличных форм. Гибриды получали скрещиванием клеток противоположных типов спаривания; отбор на селективных средах не применялся. О гибридной природе культур судили по образованию аскоспор или асков. Стадия, предшествующая мейозу, — образование хламидоспор — также специфична для диплоидных культур.

В о д н ы е в и д ы. Гибридизация позволила установить тесное родство всех водных гетероталличных и гомогетероталличных таксонов, относимых теперь к одному виду *M. bicuspidata*, но к различным разновидностям: *bicuspidata*, *australis*, *californica*, *chathamia* (Pitt, Miller, 1970). Все разновидности скрещиваются между собой, у гибридов можно индуцировать мейоз. Результаты многочисленных скрещиваний свидетельствуют, что гетероталлические штаммы всех разновидностей имеют одну и ту же систему типов спаривания, вероятно, контролируемых двумя аллелями одного гена. У гибридов штаммов одной разновидности из числа *californica*, *chathamia*, *australis* образовывалось большое количество асков с хорошо оформленными спорами. Таксономический статус разновидностей основан на низкой фертильности их гибридов. Только часть межштаммовых гибридов дрожжей var. *bicuspidata* были фертильными, тогда как самодиплоидизация родителей приводила к высокой фертильности. Как будет показано дальше, аспорогенные диплоиды образуются при отдаленных скрещиваниях, поэтому мы предполагаем, что под одним названием var. *bicuspidata* объединены дрожжи различных биологических видов.

С у х о п у т н ы е в и д ы *Metschnikowia* долго были известны как *Candida pulcherrima* и *C. reukaufii*. Их родство с водными формами впервые установлено при гибридизации. Сухопутные виды тоже обладают общей системой типов спаривания, тождественной таковой у водных видов.

Сухопутные виды *Metschnikowia* наиболее полно изучены в работах (Pitt, Miller, 1968, 1970). Опыты по гибридизации штаммов различного происхождения, относимых к *M. pulcherrima*, указывают, что этот вид является сборным. У соответствующих гибридов не происходит мейоза.

Все гибриды водных видов с сухопутными были стерильными; появлялись аномальные хламидоспоры, а аскоспоры и аски не формировались (Fell, Hunter, 1968; Pitt, Miller, 1968, 1970) (табл. 2).

Таблица 2

Гибридизация дрожжей рода *Metschnikowia* и гомология их ДНК (в %)

Гибрид	Мейоз	Гомология
<i>M. pulcherrima</i> × <i>M. pulcherrima</i>	+	103
<i>M. pulcherrima</i> × <i>M. reukaufii</i>	—	23, 19
<i>M. reukaufii</i> × <i>M. reukaufii</i>	+	
<i>M. bicuspidata</i> var. <i>bicuspidata</i> × <i>M. reukaufii</i>	—	
<i>M. bicuspidata</i> var. <i>chathamia</i> × <i>M. reukaufii</i>	—	
<i>M. bicuspidata</i> var. <i>chathamia</i> × <i>M. pulcherrima</i>	—	10
<i>M. pulcherrima</i> × <i>Metschnikowia</i> sp. (64—9)	—	31
<i>M. pulcherrima</i> × <i>Metschnikowia</i> sp. (64—13)	—	29

Данные анализа ДНК (Meyer, Phaff, 1969, 1972) хорошо согласуются с классификацией видов рода *Metschnikowia*, основанной на изучении фертильности гибридов (табл. 2).

Работам по дрожжам *Metschnikowia* свойственен один недостаток, заключающийся в том, что фертильность гибридов оценивалась не по выживаемости спор, а просто по их наличию в аске. Не исключено, что многие

гибриды штаммов одного «вида» стерильны, хотя и хорошо образуют аскоспоры. Методические трудности при выделении одиночных аскоспор, низкая выживаемость аскоспор исходных природных штаммов осложняют правильное применение биологической концепции вида.

Наиболее консервативным признаком рода является гомологичная система спаривания, позволяющая скрещиваться различным видам. Гомология типов спаривания у видов одного рода дает возможность экспериментально на основе скрещиваемости с типовыми культурами улучшить родовую классификацию дрожжей. Обобщение сведений по биологической классификации видов дрожжей привело нас к созданию генетической концепции рода у этой группы организмов (Наумов, 1978). Род — это группа скрещивающихся видов, гибриды которых размножаются вегетативно.

Объективное описание вида дрожжей возможно на основе изучения фертильности гибридов исследуемых и типовых культур. Исходные скрещиваемые штаммы должны обладать высокой выживаемостью аскоспор, в противном случае необходимо создавать специальные инбредные линии.

Литература

- Наумов Г. И. ДАН СССР, 241, 1978. — Наумов Г. И. Журн. общ. биол., 40, 1979. — Bicknell J. N., Douglas H. C. J. Bacteriol., 101, 1970. — Fell J. W., Hunter I. L. Antonie van Leeuwenhoek, 34, 1968. — Jensen V. Kgl. Vet. og Landbohjskole. Årsskr., 1967. — Johansen E., van der Walt J. P. Arch. Microbiol., 118, 1978. — Martini A. Ann. Fac. Agr. Univ. Perugia, 28, 1973. — Meyer S. A., Phaff H. J. J. Bacteriol., 97, 1969. — Meyer S. A., Phaff H. J. Proc. 1 sp. Intern. Symp. on Yeasts. Bratislava, 1972. — Pitt J. I., Miller M. W. Mycologia, 60, 1968. — Pitt J. I., Miller M. W. Antonie van Leeuwenhoek, 36, 1970. — Yarrow D., Nakase T. Antonie van Leeuwenhoek, 41, 1975. — van der Walt J. P., Johansen E. Antonie van Leeuwenhoek, 45, 1979.

Всесоюзный н.-иссл. институт
генетики и селекции
промышленных микроорганизмов
Москва

(Поступила 7 XII 1979).