EESTI NSV TEADUSTE AKADEEMIA TOIMETISED. BIOLOOGIA
ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК ЭСТОНСКОЙ ССР. БИОЛОГИЯ
PROCEEDINGS OF THE ACADEMY OF SCIENCES OF THE ESTONIAN SSR. BIOLOGY

1989, 38, 1

https://doi.org/10.3176/biol.1989.1.02

УДК 582.282.23

Геннадий НАУМОВ

ОБНАРУЖЕНИЕ ДРОЖЖЕЙ БИОЛОГИЧЕСКОГО ВИДА *SACCHAROMYCES PARADOXUS* В ЭСТОНИИ

Гибридологические методы широко применяются для изучения географического распространения и происхождения культурных и диких дрожжей *Saccharomyces sensu stricto*. Как известно, культурные дрожжи-сахаромицеты из различных регионов мира представляют собой один биологический вид *S. cerevisiae* Hansen (Наумов и др., 1983). В Европе этот вид в диком состоянии неизвестен. В природе (сокотечения дуба, неокультуренные почвы) из сахаромицетов встречается только *S. paradoxus* Batschinskaia (Наумов, 1979, 1986*а*). Третий биологический вид — *S. bayanus* Saccardo (*sensu* Vaughan-Martini, Kurtzman, 1985) выявлен нами среди сбраживающих меллибиозу дрожжей виноградарства и виноделия Европы. *S. bayanus, S. cerevisiae, S. paradoxus* — виды-двойники, хорошо идентифицируемы гибридологически: их гибриды из-за нежизнеспособности аскоспор стерильны (Наумов, 1986*а;* Наумов, Никоненко, 1987). Дрожжи *S. cerevisiae* и *S. bayanus* имеют низкую (3—24%) гомологию геномов, определяемую по реассоциации ДНК, а внутривидовые геномы — высокую (86—100%) (Vaughan-Martini, Kurtzman, 1985; Bicknell, Douglas, 1970).

Распространение диких дрожжей *S. paradoxus* в западной и северо-западной части СССР изучено недостаточно. Из сокотечений дуба в Ленинграде и Новгородской области выделено три штамма (Наумов, 1986*а*), из лесной почвы в западной Европе — семь датских штаммов (Наумов, 1979).

Участвуя в работе микологического симпозиума в ЭССР (Наумов, 1986*б*), мы имели возможность собрать сахаромицеты из сокотечений дуба на территории Эстонской ССР, включая границу с Латвийской ССР. В настоящей статье описывается генетическая идентификация этих дрожжей.

Материал и методика

Образцы дрожжей собирали вместе с корой из сокотечений дуба *Quercus robur*. Кусочки коры вырезали стерильным скальпелем и помещали в пластмассовые чашки Петри, которые транспортировали стерильно в герметичной упаковке. Дрожжи собирали в начале сентября 1986 г. в двух пунктах Валгаского р-на ЭССР: А — на границе леса и заброшенного хутора в 4 км от пос. Люллемяэ; Б — в заказнике Койва возле пос. Койккюла. В первом пункте дрожжи брали из одного сокотечения, во втором — из двух на расстоянии 1,5 км. (Все три сокотечения посещались муравьями.) Образцы хранили при 10—15 °С в течение недели, затем изучали в лаборатории ВНИИГенетики (Москва). Для выделения сахаромицетов использовали накопительные культуры. С целью угнетения роста бактерий кусочки коры инкубировали в жидкой

питательной среде, содержащей 50 г/л солодового экстракта («Merk», ФРГ) и 4 мл/л концентрированной молочной кислоты (Бабьева, Голубев, 1979). Дрожжи выращивали во всех опытах при температуре 28 °С. Во время интенсивного брожения (2—4-е сут) делали рассевы на агаризованной среде вышеприведенного состава. Через 2—3 сут колонии дрожжей отсевали штрихами на полную питательную среду, откуда на следующий день переносили (бархатом) на мальтозную среду, где свежие изоляты как сахаромицетов, так и дрожжей *Zygofabospora* хорошо спорулировали. Составы полной и мальтозной сред опубликованы ранее (Наумов и др., 1986).

Споры в генетических экспериментах индуцировали на ацетатной среде. Изоляцию спор осуществляли микроманипулятором, разрушая оболочку асков ферментативным препаратом из желудка крымской виноградной улитки *Helix* (Захаров и др., 1984). Для сравнения геномов привлекались моноспоровые культуры дрожжей известной видовой принадлежности: *S. cerevisiae* ВКМ У-502 и *S. paradoxus* CBS 5829 (ВКМ — Всесоюзная коллекция микроорганизмов, Москва; CBS — Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft). Происхождение и генетическая идентификация тест-штаммов описаны ранее (Наумов и др., 1983; Наумов, 1979, 1986*а*).

Результаты и обсуждение

Состав накопительных культур трех исследуемых образцов приведен в табл. 1. Определение родовой принадлежности дрожжей проводили по морфологии аскоспор и вегетативных клеток (Kreger-van Rij, 1984; Наумов, 1986*в*). Обращает на себя внимание факт, что наличие в большом количестве во всех проанализированных накопительных культурах дрожжей-диплонтов *Saccharomyces* образует множество аскоспор. В одной популяции обнаружены дрожжи-гаплонты *Zygofabospora* Kudriavzev emend. G. Naumov с бобовидными аскоспорами. Дрожжи *Saccharomyces* и *Zygofabospora* каждой популяции гомогенны по форме, размерам колоний, клеток и аскоспор, что позволяет проводить их генетическую характеристику на основе одного клона. Родовая и видовая принадлежность сахаромицетов устанавливается гибридологическим анализом. Этот подход использован нами при работе с различными родами дрожжей (Наумов, 1986*б*). Для гибридизации использовали только моноспоровые высокофертильные культуры (табл. 2). Изучали скрещиваемость анализируемых штаммов № 25 (Люллемяэ), № 26 (Койва I), № 27 (Койва II) с тест-культурами *S. paradoxus* CBS 5829 и *S. cerevisiae* ВКМ У-502, а также фертильность гибридов и рекомбинацию контрольных маркеров. Обе тест-культуры маркировали УФ-облучением ауксотроф-

Таблица 1

Состав накопительных культур дрожжей

Популяция	Количество изученных клонов	Содержание дрожжей, %				
		Saccharomyces	*Zygofabospora*	*Candida*	*Kloeckera*	*Torulaspora*
Люллемяэ	57	65	0	35	0	0
Койва I	54	35	17	0	0	48
Койва II	65	37	0	46	17	0

Таблица 2

Жизнеспособность аскоспор исследуемых гомоталличных дрожжей *Saccharomyces*

Штамм	Число изолированных аскотетрад	Жизнеспособные аскоспоры, %	Штамм	Число изолированных аскотетрад	Жизнеспособные аскоспоры, %
№ 25	7	93	№ 27-6B	7	64
№ 26	5	75	CBS 5829	12	100
№ 26-4B	6	63	ВКМ У-502	20	100
№ 27	5	55			

Примечание. Штамм № 26 в отличие от его моноспоровой культуры № 26-4B имел гетерогенное расщепление по скорости роста.

Таблица 3

Изучение гибридов дрожжей *S. paradoxus* (CBS 5829, № 25, 26, 27) и *S. cerevisiae* (ВКМ У-502)

Происхождение гибридов	Число скрещенных пар спор	Число полученных зигот	Число изолированных тетрад	Жизнеспособные аскоспоры, %	Расщепление ade : ADE
25×502	31	6	30	0	—
26×502	30	3	30	0	—
27×502	33	3	26	0	—
25×5829	27	5	26	66	36 : 33
26×5829	26	3	28	67	37 : 38
27×5829	30	6	21	62	23 : 29

Примечание. У гибрида 27×502 две споры образовали микроколонии. Расщепление гибридов приводится по случайной выборке спор, выделенных микроманипулятором.

ностью по аденину (ade), придающей красную окраску колониям. Удалось получить гибриды штаммов № 25, 26, 27 с дрожжами обоих видов *Saccharomyces* (табл. 3). Все гибриды спорулировали и были доступны для тетрадного анализа. Изоляция аскоспор показала стерильность гибридов у штамма *S. cerevisiae* ВКМ У-502 и фертильность гибридов дрожжей *S. paradoxus* CBS 5829 (табл. 3). Гибридная природа культур в последнем случае подтвердилась гетерозиготностью по маркеру ade; в индивидуальных асках гибридов наблюдали только моногенные типы расщеплений 2ADE : 2ade, 1ADE : 2ade, 2ADE : 1ade. Жизнеспособность аскоспор и нормальное мейотическое расщепление гибридов 25×5829, 26×5829, 27×5829 свидетельствовали о высокой гомологии геномов родительских штаммов и их принадлежности к одному биологическому виду *S. paradoxus*. Таким образом, мы получили еще одно доказательство в пользу распространения этого вида дрожжей в Европе.

Автор признателен Э. Х. Пармасто и И. П. Бабьевой за внимание к работе.

ЛИТЕРАТУРА

Бабьева И. П., Голубев В. И. Методы выделения и идентификации дрожжей. М., 1979.

Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. Н., Федорова И. В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л., 1984.

Наумов Г. И. Биологический вид Saccharomyces terrestris. // ДАН СССР, 1979, **249**, № 5, 1228—1230.

Наумов Г. И., Кондратьева В. И., Наумова Т. И., Гудкова Н. К. Генетические основы классификации дрожжей Saccharomyces cerevisiae. Изучение выживаемости аскоспор гибридов. // Ж. общ. биол., 1983, **44**, № 5, 648—660.

Наумов Г. И., Кондратьева В. И., Наумова Е. С. Методы гибридизации гомоталличных дрожжей диплонтов и гаплонтов. // Биотехнология, 1986, № 6, 33—36.

Наумов Г. И. Генетическая дифференциация и экология дрожжей Saccharomyces paradoxus Batschinskaia. // ДАН СССР, 1986*а*, 291, № 3, 754—757.

Наумов Г. И. Генетические проблемы классификации видов дрожжей. // Проблемы вида и рода у грибов. Таллин, 1986*б*, 119—128.

Наумов Г. И. Геносистематика дрожжей рода Zygofabospora Kudriavzev emend. G. Naumov. // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология, 1986*в*, № 5, 10—13.

Наумов Г. И., Никоненко Т. А. Дивергенция геномов культурных и диких дрожжей Saccharomyces sensu stricto: четыре вида-двойника. // ДАН СССР, 1987, **294**, № 2, 476—478.

Bicknell, J. N., Douglas, H. C. Nucleic acid homologies among species of Saccharomyces. // J. Bact., 1970, **101**, N 2, 505—512.

Kreger-van Rij, N. J. W. The Yeasts: A Taxonomic Study. Amsterdam, 1984.

Vaughan-Martini, A., Kurtzman, C. P. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus Saccharomyces sensu stricto. // Int. J. Syst. Bacteriol., 1985, **35**, N 4, 508—511.

ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов

Поступила в редакцию
1/VII 1987

Gennadi NAUMOV

SACCHAROMYCES PARADOXUS'E ESINEMINE EESTIS

On uuritud hariliku tamme (*Quercus robur*) tüveeritistes leiduvaid pärmseeni Valga rajoonis 1986. aastal. Kõigis kolmes uuritud populatsioonis leidus rohkesti perekonda *Saccharomyces* Meyen kuuluvaid diploidseid pärme. Hübridoloogiline analüüs näitas, et need kõik kuuluvad bioloogilisse liiki *Saccharomyces paradoxus* Batschinskaia. Tamme tüveeritistes leidus ka pärmseeni perekondadest *Zygofabospora* Kudriavzev, *Torulaspora* Lindner, *Kloeckera* Janke ja *Candida* Berkhout.

Gennadi NAUMOV

OCCURRENCE OF *SACCHAROMYCES PARADOXUS* IN ESTONIA

By using the enrichment method the author has studied the composition of yeast populations in exudates of *Quercus robur* in Estonia including the territory where it borders on Latvia. There were many diplont yeasts of *Saccharomyces* Meyen in all of three studied populations. By hybridological analyses those yeasts were identified as biological species *Saccharomyces paradoxus* Batschinskaia. The yeasts of the genera *Zygofabospora* Kudriavzev, *Torulaspora* Lindner, *Kloeckera* Janke, *Candida* Berkhout were also present in oak exudates.