

II. ДЕЙСТВИЕ ГЕНА

Ю.И.Полянский

ПРОБЛЕМА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ АДАПТАЦИЙ В СВЯЗИ С ФОРМАМИ ИЗМЕНЧИВОСТИ У СВОБОДНОЖИВУЩИХ ПРОСТЕЙШИХ (некоторые итоги и перспективы исследования)*

Институт цитологии АН СССР

Кафедра зоологии беспозвоночных ЛГУ

Норма реакции — одно из важнейших свойств генотипа. Зависимость фенотипа от условий развития — широко известное явление. В процессе эволюции модификационная изменчивость через естественный отбор выливается в форму адаптивных модификаций, значение которых в приспособлении организма к условиям среды необычайно велико (Шмальгаузен, 1946). У многоклеточных животных организмов механизмы воздействия факторов среды многоступенчаты и сложны, ибо они охватывают молекулярный, клеточный, тканевой, органный, организменный а также и биоценотический уровни организации. У простейших процессы модификационной изменчивости не осложнены межклеточными, нервными, гуморальными и другими взаимодействиями и осуществляются на клеточном уровне организации.

Эти соображения несколько лет назад и заставили нас обратиться к изучению модификационной изменчивости простейших, преимущественно свободноживущих. О некоторых итогах и дальнейших перспективах этих работ я и буду иметь честь доложить настоящему Конгрессу протозологов. Исследования, о которых пойдет речь, выполнялись в Институте цитологии Академии наук в Ленинграде и в Биологическом институте Ленинградского университета.

Основным фактором среды, влияние которого мы изучали, была температура. Этот фактор выбран не случайно. Он является неизбежным и повсеместным, испытывает значительные колебания географического и сезонного характера, и любые варианты его могут быть воспроизведены в лабораторных условиях, что чрезвычайно облегчает постановку эксперимента.

* Настоящая статья представляет собой текст доклада автора на IV Международном конгрессе протозологов 2 сентября 1973 г. (Клермон-Ферран Франция).

Известно, что среди свободноживущих простейших имеются как эвритермные, так и stenotherмные виды. Такие пресноводные инфузории, как *Nassula ornata* или *Bursaria truncatella* и некоторые другие, принадлежат к относительно stenotherмным видам. Их активная жизнь протекает в нешироком диапазоне температур. Выход за его границы вызывает инцистирование или гибель. Большая часть пресноводных свободноживущих инфузорий являются эвритермными, могут жить и размножаться в очень широком диапазоне температур. К числу их относится и обычная *Paramecium caudatum*, явившаяся одним из основных объектов наших экспериментов.

Не останавливаясь подробно на методике исследования (см.: Полянский, 1957, 1959), подчеркнем лишь, что мы работали всегда на клональных культурах в стандартных условиях среды.

Первый подлежащий разрешению вопрос сводился к тому, в какой мере теплоустойчивость инфузорий зависит от температурного режима культивирования. Основным объектом исследования была *P. caudatum*. Теплоустойчивость определялась по времени переживания инфузорий в летальной высокой температуре (чаще всего использовались температуры 39–40°). На клонах *P. caudatum* было показано, что теплоустойчивость в высокой степени зависит от термического режима среды и резко изменяется при изменении температур культивирования (табл. I).

Т а б л и ц а I

Зависимость теплоустойчивости *Paramecium caudatum* (определенной по времени переживания в минутах при 40°) от температуры культивирования (по Полянскому)

Клон	Температуры культивирования, °C		
	12 - 13	18-20	24-26
А	6,7 ± 0,16	13,9 ± 0,50	35,4 ± 0,86
	9,6 ± 0,20	17,6 ± 0,42	34,7 ± 0,30
В	6,6 ± 0,30	19,1 ± 0,30	42,4 ± 0,77
	6,1 ± 0,05	19,3 ± 0,70	31,6 ± 0,69

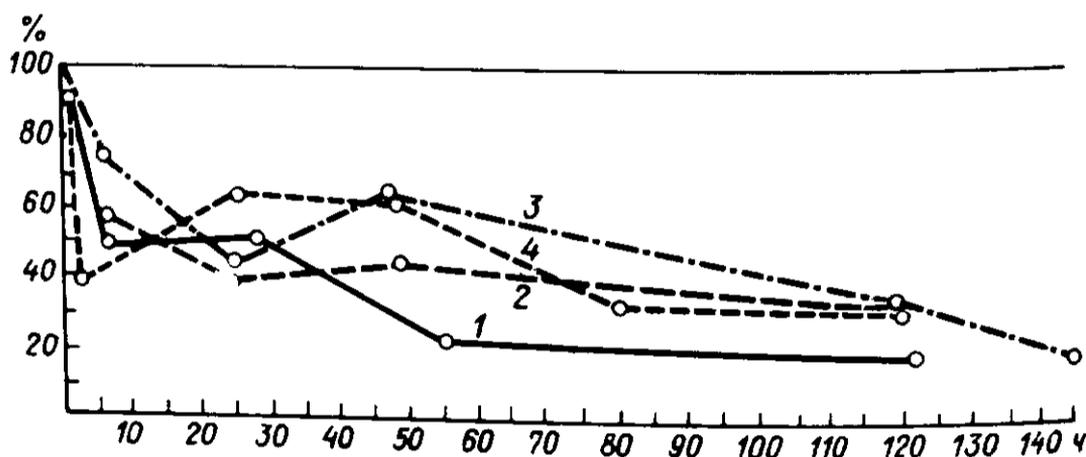


Рис. I. Изменение теплоустойчивости к 40° при переносе *Paramecium caudatum* из температуры 15-18° в 5-6° (в процентах к контролю, культивируемому при 15 - 18° (по Полянскому, 1959)).

Теплоустойчивость очень сильно падает при понижении температуры среды до 5 - 6°, как это видно на рис. 1, где приведены данные для четырех клонов *P. caudatum*. Она вновь очень быстро поднимается, если линии "холодных" инфузорий перенести в комнатную температуру (рис. 2).

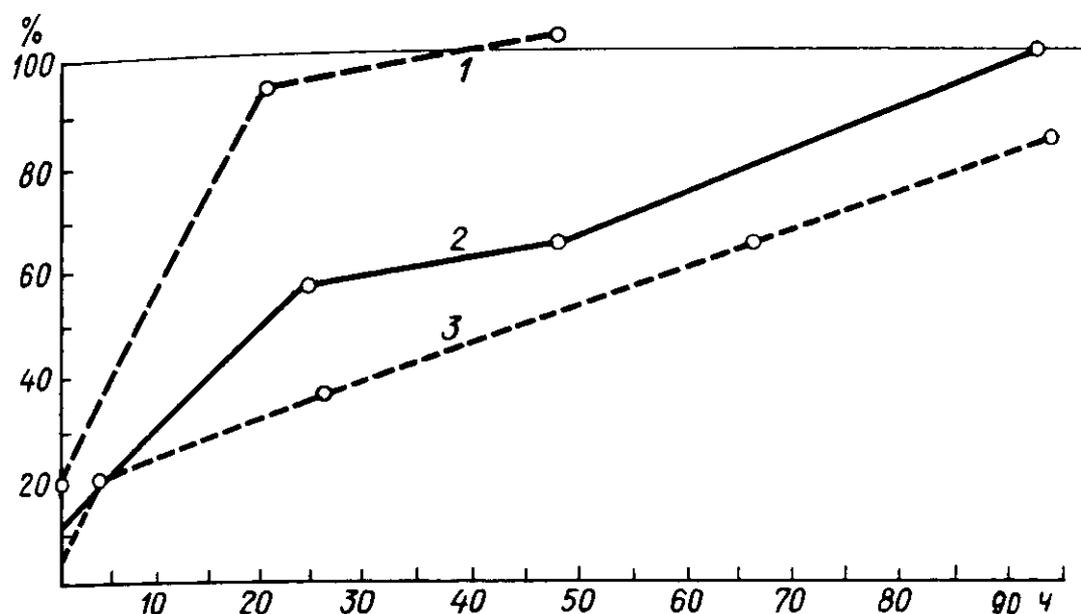


Рис. 2. Изменение теплоустойчивости к 40° при переносе *Paramecium caudatum* из температуры 5-6° в 17 - 18° (в процентах к контролю, культивируемому при 17-18°). (По Полянскому, 1957.)

Все эти изменения теплоустойчивости легко обратимы и могут быть повторены с одним и тем же клоном любое число раз. Результаты, аналогичные полученным нами на *P. caudatum*, были воспроизведены на многих других видах простейших: на свободноживущих инфузориях *Spirostomum ambiguum*, *S. minus*, *Oxytricha minor*, *Tetrahymena rugiformis* (Ирлина, 1960), *Zoothamnium* (Vogel, 1966), на паразитических инфузориях *Nyctotherus cordiformis*, *Balan-tidium elongatum*, а также на различных видах *Opalinida* (Суханова, 1959, 1962).

За последнее время в нашей лаборатории Сопиной удалось получить аналогичные результаты на нескольких клонах крупных амёб *Amoeba proteus* табл. 2.

Т а б л и ц а 2

Зависимость теплоустойчивости трех клонов *Amoeba proteus* (определяемой по времени переживания в минутах при 41°) от температуры культивирования (до данным Сопиной)

Клон	Температура культивирования, °С					
	4	10	17	25	28	31
С	21,6±0,6	24,6±0,5	30,4±0,1	42,1±0,0	42,6±1,2	51,4±1,7
В	20,8±0,5	23,5±0,3	29,3±0,3	39,5±0,8	42,2±1,0	не живут
Л	15,9±0,3	20,3±0,6	22,8±0,4	30,8±0,9	не живут	не живут

Обращает на себя внимание тот факт, что у инфузорий размах изменчивости теплоустойчивости при культивировании в разных температурах (табл. 1) значительно шире, чем у амёб (табл. 2).

Как быстро происходит изменение теплоустойчивости при изменении температуры среды?

Результаты опытов на *Paramecium caudatum* показали, что оно происходит очень быстро. При переносе инфузорий, например, из комнатной температуры в более высокую (28-29°) уже через час наблюдается вполне статистически достоверное повышение теплоустойчивости. При переносе же инфузорий из высокой температуры в более низкую теплоустойчивость столь же быстро снижается (см. рис. 1).

Повышение теплоустойчивости инфузорий можно получить в очень короткие сроки при помощи приема, который назван "тепловой закалкой". Сущность его заключается в кратковременном воздействии летальной высокой температуры на инфузорий и последующем возвращении в исходную температуру культивирования. Речь идет о кратковременном температурном "шоке", не убивающем (в силу кратковременности) инфузорий, но оказывающем, очевидно, на них весьма сильное физиологическое воздействие. В табл. 3 представлены результаты некоторых подобных опытов. Изменение теплоустойчивости происходит сразу по окончании "закалки".

Т а б л и ц а 3

Изменение теплоустойчивости *Paramecium caudatum* после "закалки" при 34° (по Полянскому и Ирлиной, 1967)

Продолжительность "закалки", мин	Клон	Средняя продолжительность выживания, мин, в 39°		Продолж. выживания "закаленных" по отношению к контролю, %
		до "закалки"	после "закалки"	
10	М Г-1-а1	7,0 ± 0,17	21,8 ± 0,51	311
10	М Г-55-а3	9,9 ± 0,16	19,0 ± 0,22	191
3	М Г-1-а1	8,5 ± 0,14	18,7 ± 0,54	220
3	М Г-55-а3	9,2 ± 0,11	15,0 ± 0,30	163

Длительное наблюдение за характером изменения теплоустойчивости при адаптации к повышенной температуре позволяет вскрыть еще одну существенную сторону этого процесса - ясно выраженный фазный характер. Типичная картина изменения теплоустойчивости при переносе из температуры 18-20° в 28-29° в течение нескольких месяцев представлена на рис. 3. Фазный характер изменения теплоустойчивости ясно виден и на рис. 1, иллюстрирующем процесс снижения теплоустойчивости при адаптации инфузорий к низкой температуре.

Нами было показано (Полянский, 1957), что коэффициент Вант-Гоффа (изменение скорости реакции при изменении температуры на 10°) при изменении сроков выживания инфузорий в различных температурах очень высок. Он колеблется в пределах 60 - 140. Это позволяет высказать предположение, что в основе данных изменений лежат не обычные физико-химические реакции, для которых коэффициент Вант-Гоффа обычно не превышает трех, а реакции, связанные с преобразованием конфигурации белковых молекул (типа обратимой денатурации), для которых характерно его высокое значение.

На рис. 4, представляющем собой полулогарифмический график, отчетливо виден характер изменения скорости гибели парамеций в зависимости от изменения температуры тестирования. Все эти факты хорошо согласуются

ся с развиваемыми В.Я.Александровым и его сотрудниками (1970) представлениями об изменении конформации белковых макромолекул как о причине изменения теплоустойчивости белков и клеток. Эти взгляды представляют дальнейшее развитие сформулированной еще в 1940 г. Д.Н.Насоновым и В.Я.Александровым белковой теории повреждения.

Прямое доказательство изменения теплоустойчивости белков-ферментов *Paramecium caudatum* при адаптации к разным температурам

было дано в нашей лаборатории в работе Л.Н.Серавина, И.И.Скобло и Д.В.Осипова (1965), изучивших теплоустойчивость нескольких ферментов при культивировании инфузорий в разных температурах. Они обнаружили по отношению к изменению теплоустойчивости из

числа ими изученных 2 группы ферментов. Первая была названа Л.Н.Серавиным термолabileными ферментами. К числу их относятся сукцинатдегидрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, и ДНК-диафразы. Их теплоустойчивость относительно невелика и оказывается различной при адаптации парамеций к разным температурам. У "теплых" линий одного и того же клона они гораздо устойчивее к нагреву, чем у линий, культивируемых при более низких температурах (в цитируемой работе инфузории культивировались при 15° и при 28°). Другая группа названа Л.И.Серавиным термостабильными ферментами (изучены кис-

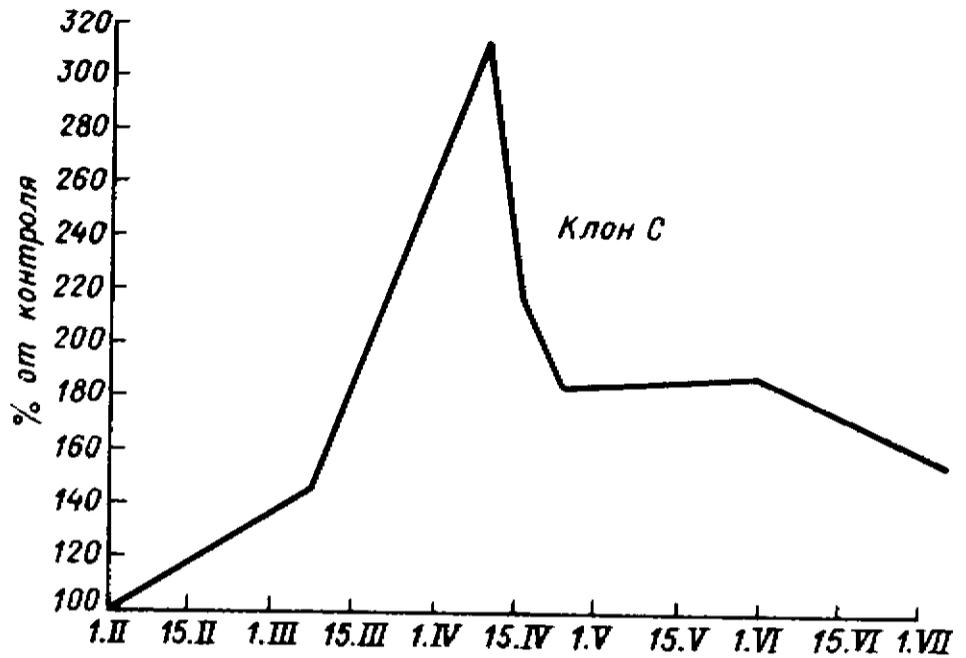


Рис.3. Кривая теплоустойчивости "теплой" линии *Paramecium caudatum*, культивируемой при температуре 28-29°, в процентах от контроля при 17-18°. (По Полянскому, 1957).

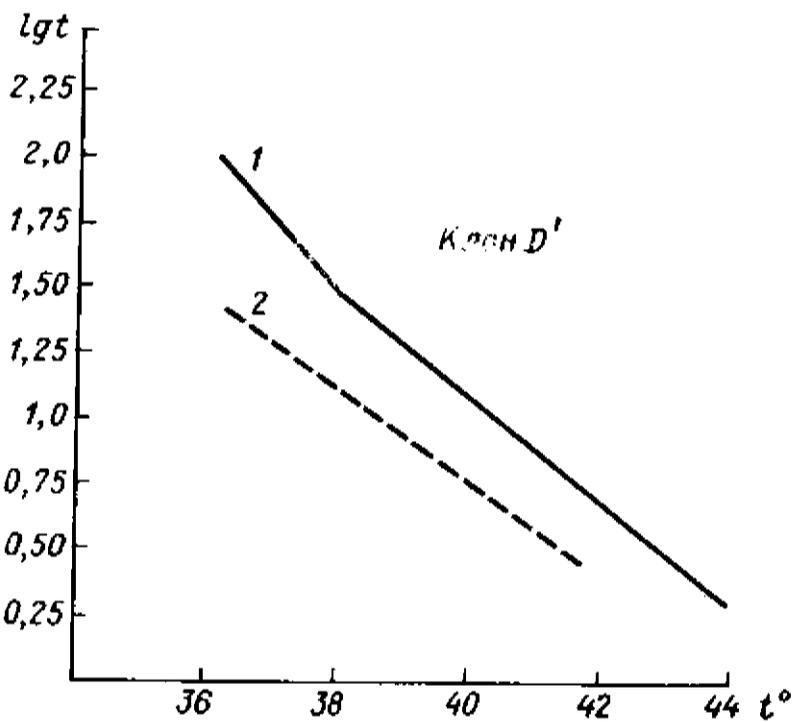


Рис.4. Скорость гибели двух линий *Paramecium caudatum* в условиях разных летальных температур, выраженная полулогарифмической кривой. (По Полянскому, 1957)

лотрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, и ДНК-диафразы. Их теплоустойчивость относительно невелика и оказывается различной при адаптации парамеций к разным температурам. У "теплых" линий одного и того же клона они гораздо устойчивее к нагреву, чем у линий, культивируемых при более низких температурах (в цитируемой работе инфузории культивировались при 15° и при 28°). Другая группа названа Л.И.Серавиным термостабильными ферментами (изучены кис-

лая фосфатаза, кислая неорганическая пирофосфатаза и неспецифические эстеразы). Они очень устойчивы к нагреву (их деятельность подавляется при температурах, близких к 70°), и теплоустойчивость их не зависит от температуры культивирования.

Адаптация к различным температурам сопровождается глубокими сдвигами в процессе внутриклеточного метаболизма. И.С. Ирлина (1963, 1967) показала, что у "теплых" *P. caudatum* преобладает цианочувствительное дыхание. "Холодные" инфузории, кроме снижения теплоустойчивости, изменяют характер обмена веществ в сторону преобладания процессов гликолиза. Параллельно изучалась активность сукцинатдегидрогеназы при адаптации парамеций к различным температурам. По данным И.С. Ирлиной, инфузории, адаптированные к 29° ("теплые"), 14° (контроль) и 4° ("холодные"), обнаружили различную активность фермента при разных температурах. Фермент "холодных" инфузорий оказался более активным при 14 и 20° , чем при 37° . Напротив, сукцинатдегидрогеназа от "теплых" инфузорий более активна при $29 - 37^{\circ}$ и менее активна при 20° . Разумеется, что все эти сравнения велись в пределах генотипически однородного материала (на клонах). Таким образом, адаптация к различным температурам связана с изменениями температурных оптимумов работы ферментов. Эти данные хорошо согласуются с приведенными выше результатами исследований Л.Н. Серавина с соавторами, показавшего что у парамеций сукцинатдегидрогеназа относится к числу "термолабильных" ферментов.

Изменение теплоустойчивости не является специфической реакцией клеток. Повышение теплоустойчивости, вызванное температурой окружающей среды, сопровождается повышением устойчивости и к ряду других повреждающих факторов. В наших опытах (Полянский, 1957) было показано, что адаптация инфузорий к 28° , повышающая их теплоустойчивость, повышает вместе с тем устойчивость к этиловому спирту, раствору глюкозы. Сходные результаты неспецифического повышения устойчивости к этиловому спирту у адаптированных к относительно высокой температуре простейших были получены и на ряде других свободноживущих и паразитических простейших (Сопина, 1963; Ирлина, 1963). Существенно отметить, что наряду с повышением теплоустойчивости к некоторым повреждающим факторам устойчивость не только не повышается, но заметно снижается. К числу таких факторов относятся цианиды (в частности, KCN). Можно думать, что это связано со специфическим действием цианидов как ядов, подавляющих дыхание. Последнее в условиях повышенной температуры протекает более интенсивно и, вероятно, поэтому быстрее повреждается цианидами.

Теплоустойчивость простейших меняется не только при изменении температурного режима, но и от множества других, "не температурных", факторов. В работах А.Ф. Орловой (1941), И.С. Ирлиной (1963), Д.А. Григорян (1965) и других было показано, что теплоустойчивость *Paramecium caudatum* существенно меняется при изменении солевого состава среды. Адаптация инфузорий к умеренно повышенным концентрациям многих солей (CaCl_2 , KCl , NaCl), а также некоторых неэлектролитов (в том числе 0,1% этилового спирта) заметно повышает их теплоустойчивость. На рис. 5 показано (в процентах по времени выживания) изменение теплоустойчивости двух клонов *P. caudatum* (культура при 4°) в зависимости от концентрации KCl . 3а

100% принято время переживания в минутах при действии 40° в исходной культуральной среде Лозина-Лозинского (Григорян, 1965). Как видно из графика, концентрация КС1 0,01 и 0,1% повышает теплоустойчивость, тогда как при 0,2% КС1 (начало повреждающего действия) теплоустойчивость близка к контролю. При дальнейшем повышении концентрации КС1 теплоустойчивость снизится ниже контроля.

На теплоустойчивость инфузорий существенное влияние оказывает пищевой фактор. При разных температурах культивирования голодание приводит к резкому снижению теплоустойчивости. Это показано К.М. Сухановой (1965) на *Paramecium caudatum* (рис. 6) и *P. putrinum*. На кривой на двух клонах парамеций показано постепенное снижение теплоустойчивости в результате голодания при комнатной температуре. Сходные результаты были получены и с *P. putrinum*.

Заметим однако, что при голодании *Amoeba proteus*, снижения теплоустойчивости не наблюдалось (Полянский и др., 1967). Вопрос о соотношении питания простейших и теплоустойчивости требует дальнейших сравнительных исследований.

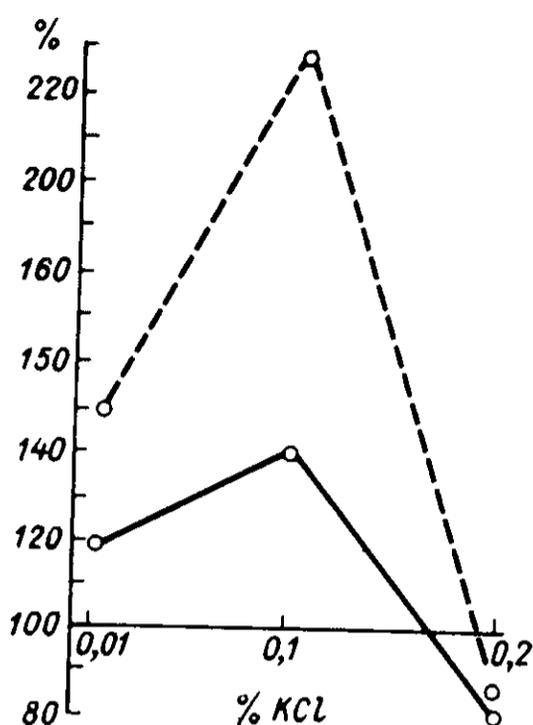


Рис. 5. Изменение теплоустойчивости двух клонов *Paramecium caudatum*, культивируемых при температуре 4° , в процессе адаптации к разным концентрациям КС1 (в процентах от контроля, культивируемого в среде Лозина-Лозинского). (По Григорян, 1965.)

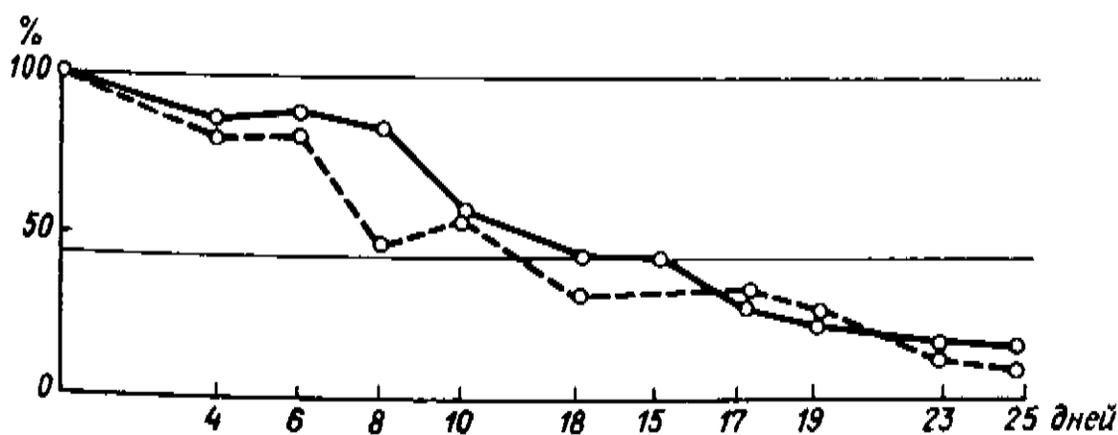


Рис. 6. Изменение теплоустойчивости двух клонов *Paramecium caudatum* в условиях голодания при комнатной температуре. (По Сухановой, 1965.)

В работе И.С. Ирлиной (1972) на *Tetrahymena rugiformis* показано, что теплоустойчивость меняется и по ходу цикла инфузории от деления к делению. Наибольшая чувствительность обнаруживается в период начала стомато-

генеза - развития цитиатуры околоротовой области. Возможно, что это связано с синтезом специфических белков, участвующих в морфогенезе околоротовой цитиатуры.

Нами изучались изменения в цитоплазме цитохимически обнаруживаемых резервных веществ - нейтрального жира и гликогена в зависимости от температуры культивирования (Полянский, 1963). Оказалось, что при относительно низких температурах гликоген и жир накапливаются в цитоплазме в очень больших количествах. Чем выше температура культивирования, тем меньше в цитоплазме обнаруживается указанных веществ. Можно думать, что это связано с быстротой расходования резервных веществ при повышении уровня метаболизма в зависимости от температуры.

Интересен вопрос об адаптациях простейших к температурам, близким к 0° . Литературные данные по этому вопросу крайне противоречивы. Нами он изучался на *Paramecium caudatum*. Удалось показать, что возможность существования парамеций в диапазоне температур от 0° до 4° всецело зависит от предшествующего температурного режима (Полянский, 1959; Полянский и Познанская, 1964). Для "теплых" линий, культивируемых при температурах выше 25° , температуры, близкие к 0° , являются летальными. Инфузории живут менее часа. Совершенно иной результат получается, если парамеций охлаждать постепенно, выдерживая их в каждой из промежуточных температур сутки и более. Особенно важно перед помещением инфузорий в 0° продержать их не менее суток в $4 - 5^{\circ}$. В результате такой постепенной и последовательной акклиматизации парамеции становятся способными жить при 0° неограниченно долгое время. В нашем опыте несколько линий *P. caudatum* жили при 0° дольше трех лет. При этом не наблюдалось никаких дегенеративных явлений. Жизненные функции осуществлялись нормально, но крайне замедленно. Например, за 45 мин у инфузорий, живущих при 0° , образуется 1-2 пищеварительных вакуоли, к тому же небольшого объема. Очень замедлен циклоз пищеварительных вакуолей. Темп деления при этой температуре очень низок и вместе с тем сильно варьирует. В среднем происходит одно деление за 20 дней. Движение парамеций не прекращается, но протекает крайне медленно. Все эти замедления жизненных функций вполне обратимы. Достаточно перевести инфузорий в более высокую температуру, как нормальные темпы жизненных функций немедленно восстанавливаются. Однако этот перенос должен осуществляться постепенно. Прямой перенос из 0° в температуры выше 25° убивает инфузорий так же, как и обратный перенос.

Приведенные факты показывают, насколько условными являются температурные границы существования для таких инфузорий, как *P. caudatum*. Методом постепенного приучения эти границы можно расширять. Вероятно, эта способность к широким адаптивным модификациям имеет важное значение в экологии инфузорий. Температура в естественных пресноводных водоемах варьирует в широких пределах. Смена температур по сезонам происходит постепенно, и парамеций можно найти в водоемах в любое время года.

Нам представлялось существенным для выяснения границ температурных адаптаций и холодоустойчивости инфузорий выяснить, в какой мере они способны выходить за границу 0° в сторону отрицательных температур и выносить переохлаждение (без образования льда). Объектом исследования послужила та же *Paramecium caudatum* (Полянский, 1963). Экспериментальное

переохлаждение возможно получить в стеклянных капиллярах диаметром менее 0,5 мм при условии медленного охлаждения. Проведенные нами опыты показали, что способность переносить переохлаждение в значительной степени зависит от предшествовавших охлаждению температур культивирования. Инфузории, взятые из "теплых" (28-29°) культур, при переохлаждении погибают очень быстро (при охлаждении до -3° через 10 мин не остается ни одной живой инфузории). Выше мы видели, что они не выдерживают и 0°. Совершенно иную картину при переохлаждении дает "холодные" (4-5°) линии парамеций. Пребывание их в течение 7 ч при -5° не вызывает гибели (опыты с большей продолжительностью действия этой температуры не ставились). Оказалось, что "холодные" линии способны выносить и гораздо большее переохлаждение. Например, при -10° 100% инфузორий выживали в течение часа, через два часа их выживало 50%. Даже -15° (более низкие температуры в капиллярах без образования льда нам получить не удавалось) в течение часа убивают лишь 50% инфузორий. Мы видим, что после "холодной закалки" (при 4-5°) *Paramecium caudatum* обладает высокой холодоустойчивостью и способна выдерживать (но без образования льда) отрицательные температуры в течение значительных сроков. Сходные с только что рассмотренными результаты получили К.М. Суханова и Т.М. Познанская (1966) с паразитирующими в кишечнике лягушек *Oralina ranarum*.

Рассмотренные выше результаты переохлаждения простейших не имеют ничего общего со способностью некоторых преимущественно паразитических простейших выносить замораживание и в замороженном виде сохранять жизнеспособность неограниченно долгое время. В переохлажденном состоянии инфузории сохраняют активными все жизненные функции, и никакого анабиоза при этом не происходит.

Явления изменения теплоустойчивости, индуцируемые условиями среды, целиком относятся к модификационной, не связанной с изменениями генотипа, изменчивости и полностью обратимы. Их можно назвать индивидуальными физиологическими адаптациями (Généthon, 1966, 1967, 1970). Характерная их особенность - обратимость - позволяет менять фенотип, не затрагивая генотипа. Все эти изменения лежат в рамках широкой нормы реакции. Однако изменения теплоустойчивости могут носить и иной характер. В литературе описаны мутационные изменения, резко меняющие теплоустойчивость инфузორий (Preer, 1957; Utaguchi, 1966). Между разными клонами инфузორий одного вида имеются наследственные (сохраняемые при аsexualном размножении) различия теплоустойчивости. Это отмечалось для разных видов инфузორий многими авторами (Jollos, 1921; Полянский и Орлова, 1948; Ирлина, 1960; Franceschi, 1964, и др.). Вопросу о наследственных различиях теплоустойчивости у *Paramecium caudatum* и выяснению механизмов наследования этих различий посвящены работы Д.В. Осипова (1966а, 1966б). Из нескольких природных популяций им было выделено 59 клонов *P. caudatum*. Они культивировались на стандартной среде при 25° не менее двух месяцев, а затем испытывались на теплоустойчивость по принятой в нашей лаборатории методике определения среднего срока переживания при 40°. В каждом клоне определение проводилось 2 раза. При всех этих испытаниях в пределах клона ни разу не было констатировано статистически достоверных различий в теплоустойчивости, т.е. при стандартных условиях

культивирования теплоустойчивость можно рассматривать как наследуемый клональный признак. При сравнении теплоустойчивости разных клонов картина получается совершенно иная. Между клонами наблюдаются различия в теплоустойчивости, в некоторых случаях довольно значительные. Например, инфузории клона 340 погибали при 40° менее чем за 2 мин, тогда как в тех же стандартных условиях культивируемые инфузории клона 346 жили около 15 мин, клона 356 - 3,7; клона 353 - 5,8; клона 348 - 7,1; клона 350 - 3,2 мин (по Д.В. Осипову).

Каковы механизмы наследственной дифференцировки различной теплоустойчивости? Имеем мы различия генотипического характера или же другие формы дифференцировки? Ответ на этот вопрос дает исследование Д.В. Осипова (1966б). Напомним, что у *P. caudatum* в отличие от *P. aurelia* периодическая аутогамия отсутствует. На гомозиготных клонах Осипов получил конъюгацию и изучал теплоустойчивость в карионидах каждого эксконъюганта. Все 8 карионид от обоих эксконъюгантов генотипически идентичны. Четыре из них имеют цитоплазму, происходящую от одного, четыре - от другого эксконъюганта. В случае если бы имела место чисто генотипическая детерминация теплоустойчивости, все 8 происходящих от эксконъюгантов клонов-карионид должны были иметь сходную теплоустойчивость. Если в определении теплоустойчивости участвует цитоплазма, то можно ожидать различий между клонами, происходящими от разных эксконъюгантов одной пары. В табл. 4 приведены некоторые результаты из исследования Д.В. Осипова.

Т а б л и ц а 4

Теплоустойчивость карионид гомозиготных линий *Paramecium caudatum* (по Осипову, 1966а)

№ карионид	Теплоустойчивость, мин, при 40°	№ карионид	Теплоустойчивость, мин, при 40°
507-а3	9,7 ± 0,11	5II-а4	6,4 ± 0,10
507-а1	12,4 ± 0,14	5II-а2	7,2 ± 0,9
507-а2	14,2 ± 0,18	5II-а3	7,4 ± 0,11
507-а4	15,0 ± 0,15	5II-а1	11,3 ± 0,14

Особенно наглядны результаты, полученные при инбридировании гомозиготного клона, где не может существовать различий между конъюгантами по цитоплазме (табл. 5).

Т а б л и ц а 5

Теплоустойчивость карионид конъюгирующей пары 262-а1 x 262-а1 *Paramecium caudatum* (по Осипову, 1966б)

№ карионид	Теплоустойчивость, мин, при 40°	№ карионид	Теплоустойчивость, мин, при 40°
I-а1	3,1 ± 0,08	I-в1	2,3 ± 0,05
I-а2	3,6	I-в3	3,9
I-а4	4,7	I-в2	4,1
I-а3	7,6 ± 0,12	I-в4	7,4 ± 0,15

Из приведенных в табл. 5 и многочисленных других полученных Д.В.Оси-

повым аналогичных данных с полной очевидностью вытекает, что разные кариониды, происходящие от одного эксконъюганта и обладающие одинаковым гено-типом, вместе с тем обнаруживают различную наследуемую при агамном размножении теплоустойчивость. Постановкой субклонов от карионид доказывает-ся, что уровень теплоустойчивости сохраняется в течение ряда поколений (разумеется, при стандартных условиях культивирования).

Изложенные факты приводят к заключению, что детерминация уровня теп-лоустойчивости происходит в момент дифференцировки макронуклеусов, кото-рые затем распределяются в процессе двух метагамных делений эксконъюган-та. Если произвести субклонирование в пределах кариониды, то различия между клонами по теплоустойчивости будут очень малы и статистически не-достоверны (табл. 6).

Т а б л и ц а 6

Теплоустойчивость субклонов *Paramecium caudatum*
от клона 5I6-a2 (по Осипову, 1966а)

№ субклонов	Теплоустойчивость, мин, при 40°	№ субклонов	Теплоустойчивость, мин, при 40°
5I6-a2-3	3,4 ± 0,14	5I6-a2-5	3,6
5I6-a2-7	3,5	5I6-a2-10	3,6
5I6-a2-9	3,6	5I6-a2-6	3,7
5I6-a2-2	3,6	5I6-a2-1	3,7
5I6-a2-8	3,6	5I6-a2-4	3,8 ± 0,16

П р и м е ч а н и е. Различия в теплоустойчивости между крайними членами приведенного ряда субклонов одной кариониды недостоверны ($t = 1,97$).

Сестринские кариониды (субклоны), макронуклеусы которых происходят пу-тем деления из одного зачатка, не обнаруживают различий по теплоустойчиво-сти. Приведенные результаты показывают, что уровень теплоустойчивости опре-деляется макронуклеусом в момент его дифференцировки. Этот вывод особенно интересен потому, что известны еще некоторые физиологические особенности инфузорий (типы спаривания, система поверхностных антигенов), которые тоже детерминируются в момент становления макронуклеусов (Sonneborn, 1957; Be-ale, 1954; Nanney, 1958) и наследуются по тому же принципу. Правда, между наследованием теплоустойчивости и типов спаривания антигенов имеются раз-личия. Для теплоустойчивости не существует ясно выраженных фенотипически альтернативно различающихся уровней, тогда как наследование типов спари-вания и антигенов носит альтернативный характер. Очевидно, в клет-ке наряду со структурными генетическими механизмами, связанными с ДНК, имеются и другие механизмы, регулирующие проявление генетических по-тенций. Эта форма изменчивости получила от Нэнни и Эфрусси (Ephrussi, 1958; Nanney, 1958) название эпигенетической (или эпигеномной). У мно-гоклеточных ее роль, очевидно, особенно существенна при клеточной диффе-ренцировке в онтогенезе. О значении эпигеномной изменчивости у простей-ших известно пока очень мало. Приведенные выше факты (типы спаривания, антигены, теплоустойчивость) позволяют высказать предположение о ее ши-роком распространении у простейших. Вопрос представляет большой теорети-ческий интерес для понимания структуры естественных популяций и механиз-мов действия естественного отбора. Но предварительно нужно разработать

экспериментальные подходы, позволяющие отличить у простейших истинно генотипическую (связанную со структурными изменениями молекул ДНК) и эпигенетическую (связанную с регуляцией функционирования гена) изменчивость. При обеих этих формах изменчивости имеет место стойкое наследование признака при агамном размножении. В работе, выполненной Л.В. Осиповым, сущность которой была только что изложена, использован один из подходов к анализу эпигеномной изменчивости. Это — кармидный анализ. Но возможность его представляет собой специальный случай, связанный с ядерным дуализмом цитоплазмы, который в большинстве других групп простейших отсутствует.

В связи с рассмотренным выше вопросом о наследственных механизмах, определяющих теплоустойчивость у инфузорий, интересно исследовать простейших, не имеющих ядерного дуализма. Это было сделано в нашей лаборатории в работе В.А. Сопиной (1968 б) на амебах. Изучались крупные *Amoeba proteus*, у которых было обнаружено несколько штаммов, обладавших различной устойчивостью к повреждающему действию высоких температур. В постоянных стандартных условиях культивирования уровень теплоустойчивости при агамном размножении сохранялся и передавался как константный наследственный признак в течение неограниченного числа поколений. Была применена методика трансплантации ядер между штаммами с различной теплоустойчивостью. Предварительно было показано, что внутриклоновая трансплантация ядер не меняет уровня теплоустойчивости амёб.

В результате многочисленных опытов В.А. Сопиной удалось показать, что во всех случаях уровень теплоустойчивости определялся ядром. При межштаммовых трансплантациях ядер уровень теплоустойчивости "гибрида" соответствовал уровню того штамма, от которого происходило ядро. Попутно заметим, что и в отношении уровня чувствительности разных штаммов амёб к различным повреждающим факторам, как-то: этиловому спирту, метионину, этим же методом трансплантации была показана ведущая роль ядра (Юдин и Сопина, 1970).

Таким образом, как у инфузорий, так и у амёб факторы, определяющие уровень теплоустойчивости, локализованы в ядре. В отношении инфузорий большую роль в этом играет эпигеномная изменчивость. Однако напомним, что у инфузорий показаны (Preer, 1957; Jgarashi, 1966, и др.) и чисто генотипические (мутационные) факторы, приводящие к изменению теплоустойчивости.

У нас нет пока достаточных данных, чтобы изменения теплоустойчивости амёб отнести к категории генотипического или же эпигеномного контроля.

Нами осталась нерассмотренной еще одна интересная и до сих пор несколько загадочная область явлений, известная под названием длительных модификаций (*Dauermodifikationen* Йоллоса). Это явление впервые было обнаружено Йоллосом на видах рода *Paramecium* и на корненожке *Arcella* (Jollos, 1921). Сущность его сводится к тому, что возникшее под влиянием внешних факторов изменение (например, повышенная теплоустойчивость, способность переносить повышенное содержание в среде As_2O_3 и другие) после прекращения воздействия индупирующего фактора сохраняется в течение десятков, а иногда и сотен агамных поколений, постепенно затухая. Конъюгация и автогамия обычно снимают длительную модификацию. Однако в немногих случаях было показано сохранение длительной модификации и после

ядерной реорганизации. Реальность длительных модификаций Йоллоса не была строго доказана, так как он работал с популяциями, что не исключало возможность отбора из исходной генотипически гетерогенной популяции.

На генетически однородном (клональном) материале реальность длительных модификаций была доказана в нашей лаборатории как по отношению к повышенной теплоустойчивости, так и к повышенному содержанию солей Са⁺⁺ и некоторым другим факторам (Орлова, 1941; Полянский и Орлова, 1948; Полянский, 1949, 1957). За последние годы вопрос о длительных модификациях у инфузорий подвергся дальнейшему исследованию в Италии (Franceschi, 1964, 1970) и во Франции (Généron, 1966, 1969, 1970). вновь была подтверждена реальность этого феномена. Изучались длительные модификации, вызванные действием высокой температуры (Franceschi), повышенным содержанием Са⁺⁺ в среде (Généron) и некоторыми другими факторами. О природе их высказано два предположения, составляющих в настоящее время предмет дискуссии. Согласно Франшеши, длительные модификации полностью связаны с цитоплазмой. Принимается существование внехромосомных цитоплазматических детерминантов, непосредственно ответственных за приобретаемые изменения. Иначе интерпретирует природу длительных модификаций Жене́рон. В основе возникновения их лежит гетерогенность макронуклеусов, возникающая в зачатках их при конъюгации или аутогамии. В нормальной популяции никакой фактор не благоприятствует наиболее устойчивым к повышенной температуре или повышенному содержанию Са⁺⁺ особям. При действии факторов, вызывающих появление длительной модификации, клональная популяция начинает испытывать давление отбора, материал для которого дает гетерогенность макронуклеусов, возникающая при их дифференцировке. Быстрее размножаются те особи, которые имеют большую устойчивость к действующему фактору (повышенная температура, повышенное содержание солей кальция и т.п.). Одновременно действуют физиологические механизмы адаптации. При прекращении действия фактора давление отбора прекращается и постепенно норма реакции возвращается к первоначальному состоянию. Учитывая наличие карионидной наследственности у инфузорий, в основе которой лежит эпигеномная изменчивость, схема, предложенная Жене́рон, представляется правдоподобной, хотя и требующей дальнейшей проверки.

Изучение длительных модификаций как своеобразной формы адаптивной изменчивости заслуживает всяческого внимания еще и потому, что они имеют, вероятно, существенное экологическое значение в природных условиях.

За последнее время мы изучали еще одну сторону адаптивных температурных модификаций у *Paramecium caudatum* (Полянский и Ирланде, 1973). Как мы видели, разные клоны обладают различной наследственно обусловленной теплоустойчивостью. Этот полиморфизм наблюдается и в пределах отдельных сингенов и в значительной своей части происходит за счет эпигеномной изменчивости (Осипов, 1966а). В данном случае под теплоустойчивостью понимается время переживания (средняя величина) в минутах при воздействии определенной летальной температуры (см. табл. I, 3, 4, 5). Но к изучению теплоустойчивости можно подойти и с другой стороны, а именно, изучать не среднюю величину теплоустойчивости культивируемых при разных температурах клонов, а размах изменчивости — норму реакции при культивировании в разных температурах. Именно в таком плане мы изучили теплоустойчивость 36 клонов *P. caudatum* самого различного происхожде-

ния. При этом оказалось, что нормы реакции в разных клонах резко различаются. Для определения нормы реакции мы изучали теплоустойчивость каждого клона при нескольких температурах, а именно, при 4, 10, 17, 22 и 28°. На рис. 7 показаны для примера кривые изменения теплоустойчивости нескольких из изученных нами клонов, причем отобраны клоны, особенно резко различающиеся по норме реакции.

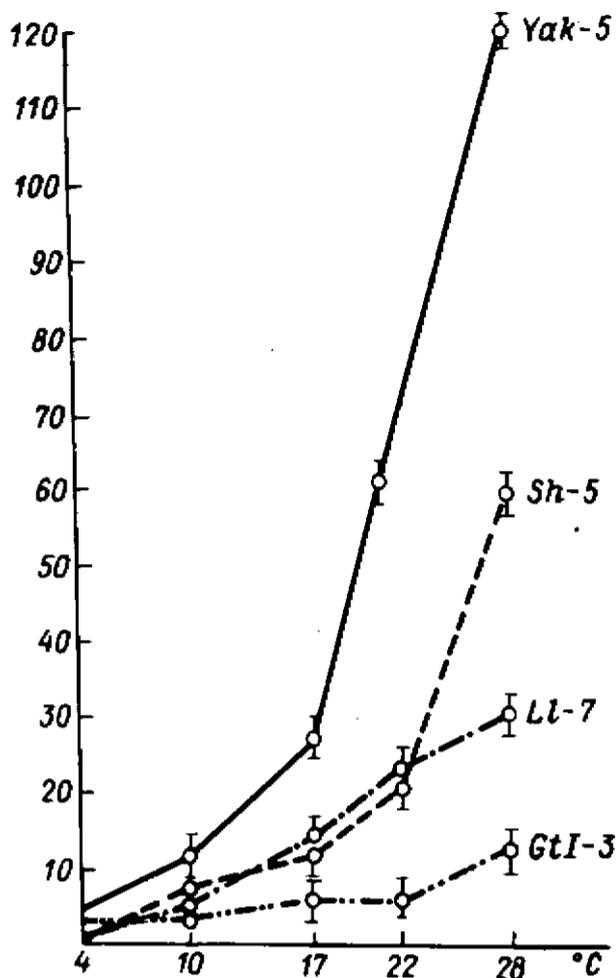


Рис. 7. Изменчивость теплоустойчивости разных линий *Paramecium caudatum*, культивируемых при разных температурах. (По Полянскому, и Ирлиной, 1973.)

Проведенное нами исследование показало, что нормы реагирования на различные температуры в разных клонах одного вида могут резко отличаться друг от друга.

В чем заключается биологическое значение широкой изменчивости (можно сказать "изменчивости изменчивости")? Какова ее природа? Опыт показал, что для каждого клона его норма реагирования остается более или менее константной при условии культивирования в стандартной среде и на одной стадии развития культуры (мы брали для определения теплоустойчивости инфузорий в начале стационарной фазы). Очевидно, продолжая анализ вопроса об изменчивости нормы реакции, следует изучить ее в плане карионидного анализа. Эту задачу мы и ставим перед собой на ближайшее время.

Приведенный выше обзор показывает, что изменчивость свободноживущих простейших изучалась за последние годы в различных направлениях. Больше всего внимания уделя-

лось проблеме теплоустойчивости и температурных адаптаций. Несмотря на обилие исследований нам кажется, что мы находимся еще в начале пути. Предстоит сделать многое. Среди многих задач нам представляется целесообразным на первый план выделить следующие:

- 1) изучать природу внутривидовой изменчивости (роль питоплазмы и ядра, физиологические механизмы изменчивости);
- 2) исследовать соотношение генотипической, модификационной и эпигенетической изменчивости в полиморфизме вида и в физиологических адаптациях;
- 3) определить природу, формы и экологическое значение длительных модификаций в разных группах простейших.

Summary

Evidence obtained by the author and his colleagues in their long-term studies on the problem of physiological temperature adaptations in Ciliates and some other free living Protozoa, are reviewed. Principal experimental facts on changes of heat- and cold-resistance depending on environmental temperature and some other non-temperature factors, are presented. Conceivable genetical mechanisms controlling the heat-resistance level, are discussed, the problem of epigenomic variation being considered in this connection. Long-lasting modifications in Protozoa, the proposed genetic mechanisms of this form of variation and its possible adaptive significance are discussed.

У к а з а т е л ь л и т е р а т у р ы

(Александров В.Я., Ломагин А.Г., Фельдман Н.Л.) Alexandrov V.Ja., Lomagin A.G., Feldman N.L. The Responsive Increase in Thermostability of Plant Cell. - "Protoplasma", 1970, v.69, p.417-458.

Григорян Д. А. Зависимость теплоустойчивости *Paramecium caudatum* от концентрации KCl и $NaCl$ в среде и концентрации эквilibрированных растворов солей. - "Цитология", 1965, т. 7, № 2, с. 218-225.

Ирлина И. С. Изменение теплоустойчивости некоторых свободноживущих простейших под влиянием предшествующего температурного режима. - "Цитология", 1960, т. 2, № 2, с. 227-234.

Ирлина И. С. Некоторые физиологические и цитохимические особенности *Paramecium caudatum* адаптированных к разным температурам. - "Цитология", 1963, т. 5, № 2, с. 183-193.

Ирлина И. С. О соответствии теплоустойчивости и активности сукцинатдегидрогеназы у *Paramecium caudatum* адаптированных к разным температурам. - В кн.: Изменчивость теплоустойчивости клеток животных в онто- и филогенезе. М.-Л., "Наука", 1967, с. 37-41.

Ирлина И. С. Теплоустойчивость *Tetrahymena pyriformis* на протяжении клеточного цикла. - "Цитология", 1972, т. 14, № 1, с. 69-79.

Насонов Д. Н., Александров В. Я. Реакция живого вещества на внешние воздействия. М.-Л., Изд-во АН СССР, 1940. 252 с.

Орлова А. Ф. Длительные модификации у *Paramecium caudatum* и *Paramecium multimicronucleatum*. - Зоол. журн., 1941, т. 20, № 3, с. 341 - 370.

Орлова А. Ф. Об адаптациях и длительных модификациях у инфузорий. - Зоол. журн., 1947, т. 26, № 6, с. 521 - 530.

Осипов Д. В. Анализ наследственных механизмов, определяющих теплоустойчивость *Paramecium caudatum*. - "Генетика", 1966а, т. 1, с. 119-131.

Осипов Д. В. Теплоустойчивость клонов *Paramecium caudatum*, взятых из разных природных популяций. - Вестник Ленингр. ун-та, 1966 б, № 3, с. 107-112.

(ПолянскИ Ю. И.) Poljansky G.I. Sur les modifications et les modifications durables des Infusoires provoquées par l'influence des températures élevées et basses et sur leur importance adaptative. - In.: XIII Congrès Intern. de Zoologie, Comp. Rend., Paris, 1949, p.204-205.

ПолянскИ Ю. И. Температурные адаптации у инфузорий. 1. Зависимость теплоустойчивости *Paramecium caudatum* от температурных условий существования. - Зоол. журн., 1957, т. 36, № II, с. 1630-1646.

ПолянскИ Ю. И. Температурные адаптации у инфузорий. 2. Изменение теплоустойчивости и холодоустойчивости *Paramecium caudatum* при культивировании при низких температурах. - "Цитология", 1959, т. I, № 6, с. 714 - 727.

ПолянскИ Ю. И. Зависимость содержания гивкогена и жира в цитоплазме *Paramecium caudatum* от температуры. - В кн.: Морфология и физиология простейших. М.-Л. Изд-во АН СССР, 1963а, с. 102-110.

ПолянскИ Ю. И. О способности инфузории туфельки переносить отрицательные температуры. - Acta Protozool., 1963б, т. I, № 4, с. 165 - 175.

ПолянскИ Ю. И., Ирлина И. С. О тепловой закалке у инфузорий. - "Цитология", 1967, т. 9, № 7, с. 791 - 799.

(ПолянскИ Ю. И., Ирлина И. С.) G.I. Poljansky a. I.S. Irlina. On the variability in the norm of reaction of *Paramecium caudatum* to various cultivation temperatures. - Acta Protozoologica, 1973, v.XII, fasc.6, p.85-95.

ПолянскИ Ю. И., Орлова А. Ф. Об адаптивных изменениях и длительных модификациях у инфузорий *Paramecium caudatum*, вызванных действием высоких и низких температур. - Докл. АН СССР, 1948, т. 59, № 5, с. 1025 - 1028.

ПолянскИ Ю. И., Познанская Т. М. Длительное культивирование *Paramecium caudatum* при 0°.- Acta Protozool., 1964, т.2, № 27, с. 271-278.

Серавин Л. Н., Скобло И. И., Осипов Д. В. Влияние температурной адаптации на теплоустойчивость ферментов инфузории *Paramecium caudatum*. - В кн.: Теплоустойчивость клеток животных. М.-Л., "Наука", 1965, с. 161-170.

Сопина В.А. Устойчивость эндопаразитических простейших некоторых видов амфибий к этиловому спирту. - "Цитология", 1963, т. 5, № 3, с. 343 - 347.

Сопина В. А. Роль ядра и цитоплазмы в наследовании теплоустойчивости у амёб. - "Генетика", 1968а, т. 4, № 7, с. 82-88.

Сопина В. А. Межклоновые различия по теплоустойчивости у амёб. - "Цитология", 1968б, т. 10, № 2, с. 207-217.

Суханова К. М. Температурные адаптации у эндопаразитических простейших амфибий. - "Цитология", 1959, т. I, № 5, с. 587-600.

Суханова К. М. Температурные адаптации у эндопаразитических простейших некоторых видов пойкилотермных животных. - Зоол. журн., 1962, т. 41, № 9, с. 1306 - 1316.

(Суханова К. М.) Sukhanova K.M. Dependence of temperature adaptations of some unicellular organisms on feeding conditions. - Acta Protozool., 1965, v.3, N 14, с.153-163.

Суханова К. М. Температурные адаптации простейших. М.-Л., "Наука", 1968. 267 с.

Суханова К. М., Познанская Т. М. К вопросу о действии отрицательных температур на некоторых эндопаразитических простейших амфибий. - В кн.: Реакция клеток и их белковых компонентов на экстремальные воздействия. М.-Л., "Наука", 1966, с. 101-109.

Полянский Ю.И., Суханова К.М., Сопина В.А., Юдин А.Л. Устойчивость *Amoeba proteus* к действию летальной температуры и этилового спирта. - В кн.: Изменчивость теплоустойчивости клеток животных в онто- и филогенезе. М.-Л., "Наука", 1967, с. 43-62.

Шмальгаузен И. И. Факторы эволюции. М.-Л., Изд-во АН СССР, 1946. 396 с.

(Юдин А. Л., Сопина В.А.) Yudin A.L., Sopina V.A. On the role of nucleus and cytoplasm in the inheritance of some characters in *Amoebae* (nuclear transfer experiments). - Acta Protozool., 1970, v. 8, N 1, с.1-39.

Beale G. The Genetics of *Paramecium aurelia*. Cambridge, 1954. 179 p.

Сгирра - Франчесчи Т. Длительные модификации. - Журн. общ. биол., 1970, т. 31, № 5, с. 572-577.

Ehrussi B. The cytoplasm and somatic Cell variation. - Journ. cellul. compar. Physiol., 1958, v.52, Suppl.1, p.35-53.

Franceschi T. Nuovi studi sull'effetto dell'autogamia in linee durevolmente modificate di *Paramecium aurelia* Syngen 1. - Bol. di Zool., 1964, v.31, N 1, p.1-14.

Générmont J. Recherches sur les modifications durables et sur le déterminisme génétique de certains caractères quantitatifs chez *Paramecium aurelia*. - These Fac.Sc.Paris, 1966. 65 p.

Générmont J. Quelques caractéristiques des populations de *Paramecium aurelia* adaptés au chlorure de Calcium. - "Protistologica", 1969, v,5, N 1, p.101-108.

Générmont J. Проблема длительных модификаций у простейших. - Журн. общ. биол., 1970, т. 31, № 6, с. 661-671.

Igarashi S. Temperature sensitive mutation in *Paramecium aurelia*. I. Induction and inheritance. - Mutation Res., 1966, v.3, p.13-24.

Jollis V. Experimentelle Protistenstudien. 1. Untersuchungen über Variabilität und Vererbung bei Infusorien. - Arch. für Protistenk., 1921, Bd.43, N 2, S. 1-222.

Nanney D. Epigenetic control System. - Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 1958, v,44, N 7, p.712-717.

Preer J. A gene determining temperature sensitivity in *Paramecium*. - Journ.Genet., 1957, v.55, N 2, p.375-378.

Sonneborn T. Breeding Systems, reproductive methods and Species Problems in Protozoa. - In.: The Species Problem. Washington, 1957. 155 p.

Vogel W. Über die Hitze und Kälteresistenz von *Zoothamnium hicketes* Frecht (Ciliata Peritricha). - Zeitschr. Wiss. Zool., 1966, Bd.173, N 3-4, S.345-378.