

• 研究报告 •

不同进化类型大肠杆菌的适合度频率依赖性

倪 川 朱璧如 张大勇*

(北京师范大学生物多样性与生态工程教育部重点实验室, 北京 100875)

摘要: 进化实验中使用竞争实验测量两个物种或基因型的相对适合度时, 通常假定两者的适合度差异是恒定的。然而竞争双方的相互作用可能导致适合度差异受到初始相对频率的影响。本研究通过测量两种进化株系的大肠杆菌(*Escherichia coli*)在不同初始相对频率下的相对适合度, 分析了初始相对频率对相对适合度的影响。结果发现高氮进化株系相对低氮进化株系的相对适合度随其初始相对频率的减小而增加, 表现出显著的负频率依赖。两种株系在培养高氮株系的滤出液中均没有显著的生长, 在培养低氮株系的滤出液中均有生长, 但高氮株系的细胞加倍次数是低氮株系的3倍, 说明导致适合度出现负频率依赖的原因可能是低氮株系的竞争能力较低, 不能完全利用培养基中的资源; 也可能是低氮株系的代谢产物能被高氮株系利用, 产生互养作用。不同的相互作用可能导致不同的初始相对频率与相对适合度间的关系, 因此, 为了更准确地衡量适合度, 进化实验中需要考虑初始相对频率对相对适合度的影响。

关键词: 竞争实验; 初始相对频率; 互养作用; 他感作用

Frequency dependent fitness in different evolved *Escherichia coli* lines

Chuan Ni, Biru Zhu, Dayong Zhang*

Key Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering of Ministry of Education, Beijing Normal University, Beijing 100875

Abstract: Differences in fitness between two species or genotypes is usually assumed to be constant when competition experiments are used to measure relative fitness in evolutionary experiments. However, interactions between competitors may lead to frequency-dependence in fitness. We measured the relative fitness of two types of evolved lines of *Escherichia coli* under different initial relative frequencies to analyze the effects of initial relative frequency on relative fitness. Competed with the low nitrogen evolved lines, the high nitrogen evolved lines displayed increased relative fitness with decreased initial relative frequency, which suggests negative frequency dependence. Both types did not grow in the filtrate from high nitrogen evolved lines, but grew in the filtrate from low nitrogen evolved lines. However, the number of cell doublings of the high nitrogen evolved lines was three times higher than that of the low nitrogen evolved lines. One probable explanation for the negative frequency dependent fitness was that the low nitrogen evolved lines had weaker resource competitive ability and could not sufficiently use resources. Another explanation was that the high nitrogen evolved lines could use some metabolites produced by the low nitrogen evolved lines, which suggests the existence of cross-feeding interaction. Different interactions may lead to different relationships between relative fitness and initial relative frequency. Therefore, we need to account for the effects of initial relative frequency on relative fitness to more accurately measure fitness in evolutionary experiments.

Key words: competition experiment; initial relative frequency; cross-feeding interaction; allelopathic interaction

竞争实验是进化生物学中测量两个物种或基因型相对适合度的常用方法。该方法通过测量竞争

双方的相对频率经过一段时间后的变化来衡量相对适合度, 相对频率增加的一方具有较高的适合

收稿日期: 2016-05-30; 接受日期: 2016-06-13

基金项目: 国家自然科学基金(31030014)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: zhangdy@bnu.edu.cn

度。通常这种方法假定两者之间的适合度差异是恒定的(Lenski, 1988; Lenski et al, 1991)。然而生态学中很多竞争实验的结果表明两个物种或基因型的竞争结果是频率依赖的(Ayala, 1971; Debenedictis, 1977; Harpole & Suding, 2007; Kerswell & Burd, 2012), 因此基于竞争实验测量的相对适合度也可能是频率依赖的, 即相对适合度会随初始相对频率变化而变化。这种频率依赖性的产生可能与竞争双方的相互作用例如他感作用(allelopathic interaction)和互养作用(cross-feeding interaction)有关。

他感作用是指竞争双方中一方会产生有毒物质而抑制另一方的生长, 甚至杀死另一方。如果产毒的一方相对频率较高, 产生的有毒物质较多, 对竞争者的抑制作用也越强, 这就会导致产毒者的相对适合度随着其初始相对频率的增加而增大。Greig和Travisano (2008)研究发现, 当产毒酵母的初始频率较低时, 其相对适合度低于不产毒的酵母; 但随着产毒酵母的初始频率增加, 其相对适合度也增加。因此他感作用可能导致正频率依赖选择(positive frequency dependent selection), 加速稀少物种或基因型的灭绝, 降低多样性(Chao & Levin, 1981)。不过最近的一些理论和实验研究表明, 当种群呈斑块状分布在异质环境中时, 正频率依赖也可能维持多样性(Molofsky et al, 2001; Molofsky & Bever, 2002; Rendueles et al, 2015)。

与此相反, 互养作用是指竞争双方中的一方产生的物质能被另一方利用, 从而导致能利用对方产物的一方相对适合度大于产生可利用物质的一方。这时能利用对方产物的一方的相对适合度将会随着自身初始频率的降低而增大, 因为这时它们可利用的资源更多。Ribeck和Lenski (2015)发现两种存在互养作用的大肠杆菌实验体系中相对适合度均随着初始频率的增加而降低。因此互养作用可能导致负频率依赖选择(negative frequency dependent selection), 从而促进物种共存(Pfeiffer & Bonhoeffer, 2004; Estrela & Gudelj, 2010)。

由此可见, 当两个竞争者间的相互作用不同时, 相对适合度随初始相对频率变化的情况也不同。所以进化生物学的研究应该充分考虑不同初始相对频率对相对适合度的影响, 这将有助于我们研究频率依赖选择, 理解不同相互作用在频率依赖选择中的作用及其对生物多样性的影响。但是目前的

进化实验研究很少考虑相对适合度的变化(Ribeck & Lenski, 2015)。因此, 本研究测量了两种不同进化类型的大肠杆菌(*Escherichia coli*)在不同初始相对频率情况下的相对适合度, 检测初始相对频率是否会影响相对适合度; 通过分析相对适合度随初始相对频率变化的模式, 探讨两种进化类型的大肠杆菌间可能存在的相互作用。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

本研究中使用两种进化类型的大肠杆菌株系是由K-12 GM4792株系分别在高、低两种氮资源环境下进化1,300代后得到的, 通过调节培养基中 NH_4Cl 的含量, 最终使高氮资源环境中氮元素含量约为654 mg/L, 低氮资源环境中氮元素含量约为4.36 mg/L。1,300代后, 进化株系的大肠杆菌在各自环境中的适合度均显著大于祖先株系, 说明它们均对自己生长的环境产生了适应性进化(倪川, 2011)。高氮环境中进化的株系标记为N+, 低氮环境中进化的株系标记为N-, 两种进化株系分别有10个重复的种群。这10个重复种群中有5个种群带有Lac+标记, 可以分解乳糖, 另外5个种群带有Lac-标记, 不能分解乳糖。两种标记的大肠杆菌能在含有X-gal的LB培养基上分别形成蓝色和白色菌落, 因此可以用含有不同Lac标记的两种进化株系进行竞争实验, 测量相对适合度。

1.2 相对适合度测量

所有的竞争实验都是在高氮资源的MOPS培养基中进行, 培养基具体配方参见倪川(2011)。竞争实验之前所有的竞争株系都要单独在该培养基中驯化培养24 h。将N+株系和N-株系的10个重复种群随机配对, 要求每个竞争对含有不同的Lac标记, 然后得到10个竞争对。分别测量每一个竞争对在5种不同初始相对频率下N+株系对N-株系的相对适合度。通过调整竞争双方混合的比例使得N+株系的初始相对频率分别为: 0.01、0.1、0.5、0.9、0.99。两个竞争者驯化培养后按照设置的初始频率取相应体积的菌液混匀, 将混合菌液以100倍的稀释倍数接入含有160 μL 新鲜培养基的96孔微孔板中, 37℃, 200 rpm振荡培养24 h; 同时取部分混合菌液稀释到合适的浓度后, 取100 μL 涂布到含有X-gal的LB培养基平板上, 37℃静止培养过夜, 通过计数平板上

蓝色和白色菌落的个数来计算初始时刻两种进化株系的种群密度($N_+(0)$ 和 $N_-(0)$)。前述混合菌液培养 24 h 后,再次使用相同的方法测量两种进化株系的种群密度($N_+(1)$ 和 $N_-(1)$),按照 Lenski 等(1991)的方法计算 N+ 株系对 N- 株系的相对适合度:
$$w = \frac{\ln(N_+(1)/\ln(N_+(0)))}{\ln(N_-(1)/\ln(N_-(0)))}$$
。 $w > 1$ 说明 N+ 株系的适合度

大于 N- 株系, $w = 1$ 说明 N+ 株系的适合度等于 N- 株系, $w < 1$ 说明 N+ 株系的适合度小于 N- 株系。每个竞争对在每种初始频率条件下重复测量两遍相对适合度,然后取平均值。

1.3 滤出液中生长情况的测量

为了进一步分析竞争双方产生的物质对竞争者的影响,我们测量了两种进化株系分别在自己和竞争对手生长后的滤出液中的生长情况。大肠杆菌的繁殖方式是无性的细胞分裂,因此可以用相同时间内细胞加倍的次数来衡量生长情况。将 24 h 驯化培养后的菌液按 100 倍稀释倍数接入 160 μ L 和 5 mL 新鲜培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm 振荡培养 24 h。之后将 5 mL 菌液用 0.2 μ m 无菌滤器过滤,除掉其中的细菌,得到滤出液。N+ 株系产生的滤出液标记为 N+F, N- 株系产生的滤出液标记为 N-F。按照相对适合度测量中设置的竞争对,从培养了 24 h 的 160 μ L 菌液中分别取出 1.6 μ L 的菌液接入 160 μ L 自己的滤出液和竞争对手的滤出液中, 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm 振荡培养 24 h,同时使用前述的涂板方法测量初始时的种群密度(N_0)。24 h 后,再次测量种群密度(N_1)。计算每个种群在 24 h 内细胞加倍的次数: $D = \ln(N_1/N_0)/\ln 2$ 。 $D > 0$ 说明种群数量增加, $D = 0$ 说明种群数量不变, $D < 0$ 说明种群数量减小。每个种群只测量 1 次。

1.4 数据分析

所有的数据分析都使用 R 软件 3.1.3 (R Core Team, 2015)。首先用单样本 t 检验分别检验每一种初始相对频率情况下, N+ 株系相比于 N- 株系的相对适合度是否显著偏离 1。然后计算每一种初始相对频率下相对适合度的平均值,对平均相对适合度和初始相对频率进行回归分析,分析相对适合度随初始相对频率的变化情况。另外我们把初始相对频率作为因子,用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验不同初始相对频率下的相对适合度是否有显著差异。用单样本 t 检验分别检验 N+ 和 N- 两种进化株系在 N+F 和 N-F 两种滤出液中的生长率是否显著偏离于 0。用两个独立样本 t 检验分别检验两种不同滤出液中,两种进化株系的生长率是否有显著差异。

2 结果

在实验设置的 5 种初始相对频率下, N+ 株系相对于 N- 株系的相对适合度均显著大于 1 (表 1)。说明在各种初始相对频率下 N+ 株系的适合度均大于 N- 株系。但是 N+ 株系的相对适合度随着它的初始相对频率的增加而减小,回归分析显示 N+ 株系的相对适合度与其初始相对频率有显著的非线性负相关关系(图 1A)。说明 N+ 株系在初始相对频率较低的时候具有较高的适合度,存在负频率依赖。单因素方差分析结果表明初始相对频率对相对适合度有显著影响($F = 22.08$, $df = 4$, $P < 0.001$),多重比较 (Tukey HSD 检验) 结果发现初始相对频率主要在较小的时候对相对适合度有显著影响,当初始频率大于 0.5 以后, 0.5、0.9 和 0.99 三种初始相对频率下的相对适合度之间并没有显著差异(表 1)。

表1 N+株系在不同初始相对频率下相对N-株系的相对适合度。使用单样本t检验,零假设是相对适合度等于1。用Tukey HSD检验对5种初始相对频率下的相对适合度进行多重比较,相对适合度右上角的字母不同表示统计差异显著。

Table 1 The relative fitness of N+ lines with different initial relative frequencies when comparing with N- lines. One sample t -tests were used and the null hypothesis was the relative fitness equaled to one. Tukey HSD test was used to do multiple comparisons for the relative fitness with different initial relative frequencies, and the different letters on the upper right indicate statistically significant difference.

N+株系初始相对频率 Initial relative frequency of N+	相对适合度 Relative fitness (mean \pm SE, n = 10)	t 统计量 t -statistic	自由度 df	P 值 P -value
0.01	1.5176 \pm 0.0760 ^a	6.812	9	<0.001
0.1	1.2992 \pm 0.0345 ^b	8.681	9	<0.001
0.5	1.0829 \pm 0.0188 ^c	4.414	9	0.002
0.9	1.0814 \pm 0.0241 ^c	3.384	9	0.008
0.99	1.0750 \pm 0.0282 ^c	2.658	9	0.026

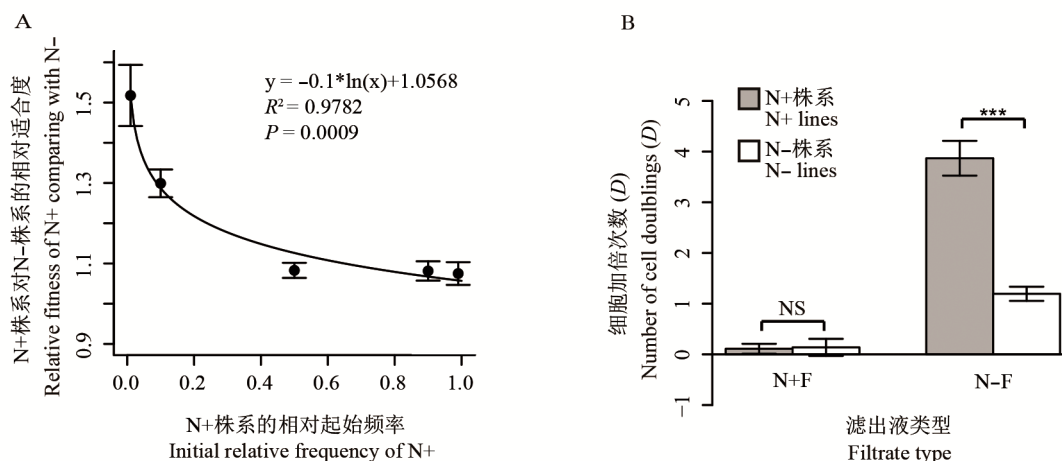


图1 N+株系的相对适合度与其初始相对频率的相关性(A)及两种进化株系的大肠杆菌在两种滤出液中的24 h内细胞加倍次数(B)。(A)图中黑点表示每种初始相对频率下N+株系相对于N-株系的相对适合度的平均值,误差线表示标准误($n = 10$)。图中曲线拟合的是平均相对适合度与初始相对频率的关系,右上角显示了拟合的方程和统计显著性。(B)图中数据显示了均值 \pm 标准误($n = 10$)。N+F和N-F分别是N+株系和N-株系培养24 h后的滤出液。*** $P < 0.001$, NS表示 $P > 0.05$ (两个独立样本 t 检验)。

Fig. 1 The relationship between relative fitness and initial relative frequency of N+ lines (A), and the number of cell doublings (D) of two types of evolved *Escherichia coli* lines in two different filtrates (B). (A) The black dots show the mean relative fitness of N+ lines comparing with N- lines, and the error bars show SE ($n = 10$). The curve indicates the regression model, whose equation and statistical significance are showed upper right. (B) Data show mean \pm SE ($n = 10$). N+F and N-F indicate filtrate prepared from 24 h cultures of N+ lines and N- lines, respectively. *** $P < 0.001$, and NS indicates $P > 0.05$ (two independent sample t -tests).

两种进化株系在N+F滤出液中均没有生长, N+株系的细胞加倍次数为 0.110 ± 0.098 (平均值 \pm 标准误, $n = 10$), N-株系的细胞加倍次数为 0.137 ± 0.169 , 单样本 t 检验显示两者均不显著偏离0 (N+株系: $t = 1.1266$, $df = 9$, $P = 0.289$; N-株系: $t = 0.8149$, $df = 9$, $P = 0.436$), 并且两者间没有显著的差别($t = -0.138$, $df = 14.467$, $P = 0.892$) (图1B)。说明培养N+株系24 h以后, 培养基中可利用的资源已经耗尽, 两种进化株系的种群数量保持不变。两种进化株系在N-F滤出液中均有生长, N+株系的细胞加倍次数为 3.8691 ± 0.3430 , N-株系的细胞加倍次数为 1.1948 ± 0.1398 , 单样本 t 检验的结果显示两者均显著大于1 (N+株系: $t = 11.279$, $df = 9$, $P < 0.001$; N-株系: $t = 8.5439$, $df = 9$, $P < 0.001$)。说明培养N-株系24 h以后, 培养基中还有可以被利用的资源。虽然两种进化株系在N-F滤出液中均有生长, 但是N+株系的生长显著大于N-株系($t = 7.219$, $df = 11.911$, $P < 0.001$) (图1B)。

3 讨论

本研究测量了两种进化类型的大肠杆菌在不同初始相对频率下的相对适合度, 发现N+株系相

对N-株系的相对适合度随着N+株系初始相对频率的减小而增加, 表现为负频率依赖。这种负频率依赖可能与两种进化株系资源竞争能力的差异有关。生物对有限资源的竞争能力可以用其降低环境中有限资源含量的能力表示, 即竞争能力越强, 越能充分利用环境中的有限资源(Tilman & Wedin, 1991)。滤出液的结果显示两种大肠杆菌株系在N+F滤出液中均没有显著的生长, 但在N-F滤出液中均能生长(图1B), 说明N+株系在24 h后就已经将培养基中的资源消耗殆尽, 而N-株系则不能完全利用培养基中的资源。这表明N+株系竞争资源的能力大于N-株系。因此当N-株系相对频率增加时, 由于N-株系不能充分利用资源, N+株系能利用的资源相对增加, 有利于种群增长, 其相对适合度增加。

另外, 相对适合度的负频率依赖也可能暗示了这两种进化类型的大肠杆菌间存在互养作用。在资源贫乏的环境中, 生物可能通过快速吸收有限的资源来提高自己的适合度, 但资源的吸收和利用常常存在权衡关系, 即快速的资源吸收可能导致低效的资源利用。例如在葡萄糖受限环境中进化的大肠杆菌虽然提高了吸收葡萄糖分子的能力, 但是不能充分代谢葡萄糖分子, 因而产生部分降解的代谢产

物, 这些代谢产物可能被其他株系利用, 从而形成互养关系(Helling et al, 1987; Rosenzweig et al, 1994; Turner et al, 1996; Treves et al, 1998; Rozen & Lenski, 2000)。本研究使用的N-株系是在极度缺氮的环境中进化的, 提高了吸收氮资源的速率(倪川, 2011), 因此有可能不能充分利用吸收的资源, 产生代谢不完全的产物, 这些产物能被N+株系利用, 从而形成互养作用。在培养N-株系24 h后的滤出液中, 虽然两种株系的大肠杆菌均有生长, 但是N+株系的生长率约是N-株系的3倍, 可能是因为N-株系无法彻底利用培养基中的资源, 也有可能是N-株系分泌的某些代谢产物能被N+株系利用, 促进它们的生长。

虽然N+株系相对N-株系的相对适合度表现出负频率依赖, 但N+株系的相对适合度始终显著大于N-株系, 并且当N+株系的初始相对频率大于0.5以后, N+株系相对N-株系的相对适合度基本保持一致(图1A)。Ribeck和Lenski (2015)的模型预测, 如果只存在互养作用, 那么相对适合度随初始相对频率的变化应该是线性负相关, 如果不是线性, 说明还存在其他的相互作用。在本研究中, 当N+株系初始相对频率较高时, 互养作用的效用较小, 这可能是由于他感作用导致了N+株系较高的适合度。但在N+F滤出液中, 两种进化株系均没有显著的生长, 且两者的生长率并没有显著差异, 说明N+株系的代谢产物并未对N-株系产生毒害作用。因此本研究使用的两种大肠杆菌株系间不太可能存在他感作用。另一种可能的解释就是当N+株系的初始相对频率大于0.5以后, 双方的相互作用主要是资源竞争, 并且相对竞争能力不再随初始相对频率变化。

本研究中相对适合度表现出明显的频率依赖性, 这一结果显然与进化实验中通常假定的恒定相对适合度不符, 但不能确定在各种不同的进化实验系统中是否普遍存在这种频率依赖的相对适合度现象。因为通常采用竞争实验测量相对适合度时使用的都是0.5的初始相对频率, 很少有研究在多种初始相对频率下测量相对适合度。因此有必要在不同的实验系统中衡量初始相对频率对相对适合度的影响。这样不仅能更加准确地测量相对适合度, 还能通过分析初始相对频率与相对适合度间的相关关系研究不同进化类型间可能存在的相互作用。

参考文献

- Ayala FJ (1971) Competition between species: frequency dependence. *Science*, 171, 820–824.
- Chao L, Levin BR (1981) Structured habitats and the evolution of anticompetitor toxins in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 78, 6324–6328.
- Debenedictis PA (1977) Meaning and measurement of frequency-dependent competition. *Ecology*, 58, 158–166.
- Estrela S, Gudelj I (2010) Evolution of cooperative cross-feeding could be less challenging than originally thought. *PLoS ONE*, 5, e14121.
- Greig D, Travisano M (2008) Density-dependent effects on allelopathic interactions in yeast. *Evolution*, 62, 521–527.
- Harpole WS, Suding KN (2007) Frequency-dependence stabilizes competitive interactions among four annual plants. *Ecology Letters*, 10, 1164–1169.
- Helling RB, Vargas CN, Adams J (1987) Evolution of *Escherichia coli* during growth in a constant environment. *Genetics*, 116, 349–358.
- Kerswell KJ, Burd M (2012) Frequency-dependent and density-dependent larval competition between life-history strains of a fly, *Lucilia cuprina*. *Ecological Entomology*, 37, 109–116.
- Lenski RE (1988) Experimental studies of pleiotropy and epistasis in *Escherichia coli*. I. Variation in competitive fitness among mutants resistant to virus T4. *Evolution*, 42, 425–432.
- Lenski RE, Rose MR, Simpson SC, Tadler SC (1991) Long-term experimental evolution in *Escherichia coli* 1: adaptation and divergence during 2000 generations. *The American Naturalist*, 138, 1315–1341.
- Molofsky J, Bever JD (2002) A novel theory to explain species diversity in landscapes: positive frequency dependence and habitat suitability. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269, 2389–2393.
- Molofsky J, Bever JD, Antonovics J (2001) Coexistence under positive frequency dependence. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268, 273–277.
- Ni C (2011) The Experimental Evolution of *Escherichia coli* in Nitrogen Limited Environment. PhD dissertation, Beijing Normal University, Beijing. (in Chinese with English abstract) [倪川 (2011) 大肠杆菌在缺氮环境下的实验进化. 博士学位论文, 北京师范大学, 北京.]
- Pfeiffer T, Bonhoeffer S (2004) Evolution of cross-feeding in microbial populations. *The American Naturalist*, 163, E126–E135.
- R Core Team (2015) R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Rendueles O, Amherd M, Velicer GJ (2015) Positively frequency-dependent interference competition maintains diversity and pervades a natural population of cooperative microbes. *Current Biology*, 25, 1673–1681.

- Ribeck N, Lenski RE (2015) Modeling and quantifying frequency-dependent fitness in microbial populations with cross-feeding interactions. *Evolution*, 69, 1313–1320.
- Rosenzweig RF, Sharp RR, Treves DS, Adams J (1994) Microbial evolution in a simple unstructured environment: genetic differentiation in *Escherichia coli*. *Genetics*, 137, 903–917.
- Rozen DE, Lenski RE (2000) Long-term experimental evolution in *Escherichia coli* VIII: dynamics of a balanced polymorphism. *The American Naturalist*, 155, 24–35.
- Tilman D, Wedin D (1991) Plant traits and resource reduction for 5 grasses growing on a nitrogen gradient. *Ecology*, 72, 685–700.
- Treves DS, Manning S, Adams J (1998) Repeated evolution of an acetate-crossfeeding polymorphism in long-term populations of *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*, 15, 789–797.
- Turner PE, Souza V, Lenski RE (1996) Tests of ecological mechanisms promoting the stable coexistence of two bacterial genotypes. *Ecology*, 77, 2119–2129.

(责编编委: 张全国 责任编辑: 时意专)