



ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

P19-85-649

В.Л.Ильина, В.И.Корогодин

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО РЕАЛЬНОСТИ
УВЕЛИЧЕНИЯ ЧАСТОТЫ
ВОЗНИКНОВЕНИЯ РЕВЕРСОВ
У ГАПЛОИДНЫХ ДРОЖЖЕЙ
ПРИ УМЕНЬШЕНИИ СОДЕРЖАНИЯ АДЕНИНА
В СРЕДЕ

Направлено в журнал "Генетика"

1985

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе^{/1/} было показано, что частота спонтанного возникновения реверсов у ауксотрофных по аденину гаплоидных дрожжей-сахаромыцетов быстро возрастает при уменьшении содержания аденина в среде. Было показано также^{/2/}, что этот эффект в равной мере ярко выражен как у дефектных по репарации клеток (штамм 8П-59, а *ade2-192 rad2*), так и у клеток с нормальным репарационным генотипом (штамм p192, а *ade2-192*); влияние мутации в гене *rad2* проявлялось только в увеличении абсолютных значений частот возникновения реверсов.

В работе^{/1/} были приведены данные, свидетельствующие о том, что наблюдаемый эффект не является следствием таких артефактов, как преимущественная гибель ауксотрофных клеток на средах с меньшими содержаниями аденина или неполное выявление реверсов, образующихся в колониях ауксотрофных клеток на средах с большими содержаниями аденина. Оставался, однако, еще один возможный артефакт - негативное влияние клеток исходного штамма на жизнеспособность вновь образующихся реверсов; наличие такого "селективного эффекта" у некоторых штаммов бактерий отмечал еще В.Браун^{/3/}. В этом сообщении приводятся прямые экспериментальные доказательства того, что описанный нами^{/1,2/} феномен вполне реален, а не обусловлен таким артефактом.

Схема экспериментов основывалась на следующих соображениях. Как мы уже отмечали^{/1,2/}, уменьшение выхода реверсов при увеличении содержания аденина в среде наблюдается лишь тогда, когда аденин служит лимитирующим рост фактором, т.е. когда на средах с более высоким содержанием аденина вырастает больше дрожжей, а отдельные колонии (при одинаковой густоте посева) содержат соответственно больше клеток, чем на средах с меньшими содержаниями аденина. Допустим, что меньший выход реверсов на более богатых аденином средах обусловлен "селективным эффектом", степень выраженности которого усиливается с увеличением числа клеток в колониях. В этом случае при такой постановке опытов, когда на средах с разным содержанием аденина образовывались бы как очень мелкие, так и очень крупные колонии дрожжей, "селективный эффект" неизбежно сказывался бы на регистрируемых частотах ревертирования: различия в частотах возникновения реверсов на средах с разным содержанием аденина наблюдались бы лишь при больших различиях в размерах колоний, а в случае очень мелких колоний должны были бы нивелироваться.

Объектом служили гаплоидные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, штамм p192 (а *ade2-192*), полученный от И.А.Захарова (ЛПИФ АН СССР). Выросшие на полной среде дрожжи рассевали в большое число чашек Петри со стандартной минимальной средой^{/4/}, содержащей I или IO мг/л аденина. Часть чашек каждого варианта использовали в качестве "контроля", а остальные - в качестве "опыта" (обозначения: К.I и Оп.I - контроль и опыт на среде с I мг/л аденина, К.IO и Оп.IO - контроль и опыт на среде с IO мг/л аденина). Чашки инкубировали при 30°C.

Колонии, растущие в группах Оп.I и Оп.IO, через каждые 6 час в течение 2 сут растирали шпательными по всей поверхности чашек; как показало микроскопирование, число составляющих такие колонии клеток в течение всего этого срока не превышало нескольких десятков. Колонии, растущие в группах К.I и К.IO, подвергли "процедуре растирания" лишь один раз - в конце 48-го часа инкубации.

Таким образом, в группах Оп.I и Оп.IO на протяжении всех 48 ч дрожжи росли фактически не в виде отдельных колоний, а в виде газона, состоящего из небольших групп клеток. В группах К.I и К.IO до 48 ч дрожжи росли в виде отдельных колоний, а позже - также в виде газона. Реверсы или группы реверсов, образовавшиеся за первые 48 ч, во время растирания шпателью распределялись по газону, оставаясь в тех же чашках Петри, где они и возникали.

В нескольких чашках из каждой группы опытов колонии ни разу не растирали, для последующего подсчета их числа. После последнего растирания, т.е. в конце 48-го ч инкубации, в нескольких случайно выбранных из каждой группы чашках (по 4 чашки на группу) путем смыва и последующего подсчета в камере Горяева определяли "урожайность" - общее число дрожжевых клеток на чашку. Остальные чашки с растертыми колониями продолжали инкубировать в термостате.

В предварительных (модельных) опытах было установлено, что плотность газонов, образующихся в течение 2 сут из ауксотрофных клеток на средах с I и IO мг/л аденина, не влияет на жизнеспособность вновь сформировавшихся в такие газоны клеток реверсов: число образующихся колоний реверсов было примерно равно числу этих клеток. Колонии реверсов хорошо выявлялись на фоне газонов в течение 4 сут инкубации (в чашках с I мг/л аденина такие колонии были крупными, а в чашках с IO мг/л аденина - мельче), тогда как колонии, образуемые реверсами, возникавшими из ауксотрофных клеток газона после последнего растирания, проявлялись в более позднее время.

В основных опытах спустя 4 сут инкубации после последнего растирания в некоторых чашках каждой группы на фоне сплошного красного газона также хорошо выявлялись отдельно четко различимые белые или розовые колонии реверсов, вырастающие из тех клеток-ревертантов, которые возникали в этих чашках в предшествующие 2 сут инкубации. В этот срок мы и проводили подсчет числа тех чашек в каждой группе, которые не содержали ни одной колонии реверсов, и тех, которые содержали хотя бы одну (и более) такую колонию.

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методам. Частоту ревертирования рассчитывали по формуле $R = \frac{1}{m} \ln \frac{N}{N_0}$, где m — среднее число клеток в одной чашке Петри, N — общее число чашек в данной группе, а N_0 — число чашек в данной группе, не содержащих ни одной колонии реверсов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среднее число колоний, выросших в каждой чашке без растирания, равнялось 120 ± 6 независимо от того, содержала ли питательная среда 1 или 10 мг/л аденина. В чашках, в которых проводили растирание, урожайность к 48 ч не различалась достоверно между контрольными и опытными группами ($p > 0,5$) и при 1 мг/л аденина равнялась в среднем $(0,67 \pm 0,16) \cdot 10^7$ клеток, а при 10 мг/л аденина — $(1,41 \pm 0,25) \cdot 10^7$ клеток; различия в урожайности между этими вариантами опыта статистически значимы ($p < 0,05$). Таким образом, к 48 ч число клеток в одной колонии в группе К.1 было равно в среднем $3,5 \cdot 10^4$, а в группе К.10 — $1,2 \cdot 10^5$.

Общее число N чашек в каждой группе, число N_0 чашек, не содержащих ни одной колонии реверсов, соответствующие статистики и оценки частот ревертирования приведены в таблице. Различия между контрольными и опытными группами каждого варианта по относительному числу чашек, содержащих и не содержащих колонии реверсов, оказались недостоверными; следовательно, недостоверны и небольшие различия между оценочными значениями частот ревертирования в группах К.1 и Оп.1, а также К.10 и Оп.10 (предпоследний столбец таблицы). Поэтому данные, относящиеся к группам К.1 и Оп.1, а также К.10 и Оп.10, можно было объединить. Полученные таким путем значения частот ревертирования для обоих вариантов опытов (последний столбец таблицы) различались в десять раз, причем различие это высоко достоверно ($p < 0,001$).

Итак, в условиях наших экспериментов независимо от того, образовывали ли дрожжи микроколонии, состоящие из нескольких десятков клеток,

или довольно крупные колонии, состоящие из $5,3 \cdot 10^4$ (при 1 мг/л аденина) или из $1,2 \cdot 10^5$ (при 10 мг/л аденина) клеток, размеры этих колоний не влияли на регистрируемую частоту возникновения реверсов. Частота эта при 1 и 10 мг/л аденина, равная соответственно $2,39 \cdot 10^{-7}$ и $0,24 \cdot 10^{-7}$, не зависела от размеров колоний аукоотрофных клеток, а обуславливалась только содержанием аденина в среде.

Таблица

Влияние содержания аденина в среде на частоту возникновения реверсов у дрожжей, растущих в виде крупных колоний (К.1 и К.10) или в виде разрозненных мелких групп клеток (Оп.1 и Оп.10)

Содержание аденина, мг/л	Группа опытов	N	N ₀	Статистики		Частота ревертирования	
				χ^2	p	r	R
1	К.1	33	3	1,01	0,8	$2,06 \cdot 10^{-7}$	$2,39 \cdot 10^{-7}$
	Оп.1	35	6			$2,80 \cdot 10^{-7}$	
10	К.10	53	37	0,21	0,9	$0,26 \cdot 10^{-7}$	$0,24 \cdot 10^{-7}$
	Оп.10	31	23			$0,21 \cdot 10^{-7}$	

Обозначения: N — общее число чашек Петри;
 N₀ — число чашек, не содержащих колонии реверсов;
 r — частота ревертирования для каждой группы;
 R — частота ревертирования для данного содержания аденина в среде.

В этих опытах частоты ревертирования оценивали для периода роста культур, охватывающего примерно первую треть экспоненциальной фазы. Различия же в частотах ревертирования при разном содержании аденина в среде были примерно такими же, что и полученные ранее^[2] для разных периодов стационарной фазы роста. Это хорошо подтверждает предположение^[1,2], что связь между частотой ревертирования аукоотрофных по аденину дрожжей и содержанием аденина в среде, наблюдавшаяся у дрожжевых культур разного возраста, обуславливается влиянием на мутационный процесс дефицита этого метаболита, а не другими сопутствующими факторами, такими, как неполное проявление реверсов или преимущественная гибель аукоотрофных клеток или возникающих из них ревертантов при разных условиях культивирования.

Авторы благодарят Ч.Файси за обсуждение схемы экспериментов и помощь в их планировании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ильина В.Л. и др. Влияние содержания аденина в питательной среде на частоту возникновения реверсов у гаплоидных дрожжей. Препринт ОИЯИ Р19-84-171, Дубна, 1984.
2. Ильина В.Л. и др. Зависимость частоты спонтанного возникновения реверсов у гаплоидных дрожжей разных генотипов от содержания аденина в среде и от возраста культур. Препринт ОИЯИ Р19-85-191, Дубна, 1985.
3. Браун К. Генетика бактерий. "Наука", М., 1968.
4. Захаров И.А. и др. Сборник методов по генетике дрожжей-сахаромикетов. "Наука", Л., 1984.

Рукопись поступила в издательский отдел
2 сентября 1985 года.

Ильина В.Л., Корогодин В.И. P19-85-649
Доказательство реальности увеличения частоты
возникновения реверсов у гаплоидных дрожжей
при уменьшении содержания аденина в среде

На гаплоидных дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, штамм p192 (a ade2-192), в прямом эксперименте показано, что при выращивании на твердых средах, содержащих 1 и 10 мг/л аденина, частоты ревертирования, равные соответственно $2,39 \cdot 10^{-7}$ и $0,24 \cdot 10^{-7}$, не зависят от того, из какого числа клеток /от нескольких десятков до 10^5 / состоят колонии, образующиеся на той или другой среде. Это означает, что указанное десятикратное различие в частотах ревертирования не связано с "селективным эффектом", а обуславливается только разным исходным содержанием в среде аденина.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1985

Ilyina V.L., Korogodin V.I. P19-85-649
Reality Proof of the Increase of Reversion
Frequency in Haploid Yeast with the Decrease
of Adenine in the Medium

It is shown by the direct experiment on the haploid yeast *Saccharomyces cerevisiae*, strain p192 (a ade2-192), that if cultivated in the solid media containing 1 and 10 mg/1 of adenine, the reversion frequencies which are $2.39 \cdot 10^{-7}$ and $0.24 \cdot 10^{-7}$ do not depend on the number of cells (from a few tens to 10^5) in colonies growing on either medium. This means that the mentioned tenfold difference in the reversion frequencies is not connected with the "selection effect" but caused by the various initial content of adenine in the media.

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Problems, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1985