

СООБЩЕНИЯ  
ОБЪЕДИНЕННОГО  
ИНСТИТУТА  
ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ  
ДУБНА

K681

P19-88-766

В.Л.Корогодина, В.И.Корогодин, Ч.Файси

ДИНАМИКА ВЫЯВЛЕНИЯ ЛОКУСНЫХ  
И СУПРЕССОРНЫХ РЕВЕРСОВ  
ПРИ ИНКУБАЦИИ АУКСОТРОФНЫХ  
ПО АДЕНИНУ ДРОЖЖЕЙ  
НА СЕЛЕКТИВНОЙ СРЕДЕ

1988

## ВВЕДЕНИЕ

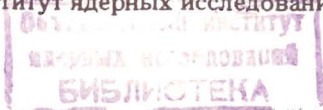
Для изучения влияния условий культивирования на частоту возникновения реверсов у ауксотрофных дрожжей мы предложили следующую методику<sup>1/</sup>. Клетки исходной культуры дрожжей с помощью металлического репликатора наносят на ядерные фильтры, покрывающие питательную среду, разлитую в чашки Петри. После инкубации в течение требуемого времени в термостате эти фильтры, вместе с выросшими на них колониями, переносят в новые чашки Петри на селективную среду, не содержащую незаменимого метаболита. На селективной среде преимущества в росте приобретают колонии реверсов, которые и вырастают постепенно на поверхности первичных колоний. Выявление реверсов на селективной среде происходит в течение 8-10 суток и описывается двувёршинной кривой. Первую волну этой кривой составляют преимущественно реверсы, возникающие в колониях ауксотрофных клеток до их переноса на селективную среду, а вторую волну — реверсы, возникающие уже после переноса на селективную среду, в основном, за счет остаточного роста<sup>2/</sup>. Если ограничиваться учетом общего числа возникающих реверсов, то регистрации тех из них, которые составляют первую волну, оказывается вполне достаточно<sup>2/</sup>. Если же учитывать отдельно реверсы разных типов, и прежде всего локусные и супрессорные, соотношение которых в зависимости от условий культивирования может изменяться в десятки раз<sup>3,4/</sup>, то желательнее более тщательно выяснить динамику их выявления: даже небольшие различия в скоростях образования колоний разных реверсов могут существенно повлиять на их соотношение, регистрируемое в тех или иных условиях.

Результаты изучения динамики выявления колоний реверсов на селективной среде описаны в настоящей работе. При планировании опытов мы учитывали, что различия в сроках выявления разных реверсов могут быть связаны с такими факторами, как природа реверсов, состав питательной среды, размеры колоний ауксотрофных клеток, эти реверсы содержащих, различия в положении клеток в таких колониях и различия в сроках их возникновения.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДИКИ

### Штаммы

В работе использовали следующие штаммы ауксотрофных гаплоидных дрожжей *Saccaromyces cerevisiae*: p-192 (a ade2-192), полученный от проф. И.А.Захарова; ДК769-172 (a ade2-192 lys5-3), любезно синтезированный для нас доктором А.Б.Девиним путем скрещивания клеток штамма 769-p192-15В-п4



(a ade2-192 lys5-3), полученного от доктора Д.А.Горденина, с клетками прототрофного штамма 172 из коллекции проф. Р.Мортимера, и последующего выделения сегрегантов с указанными маркерами.

#### Проведение опытов

Клетки дрожжей, выращенных на полной среде (ПС) <sup>15/1</sup>, с помощью инокулятора наносили на ядерные фильтры, покрывающие поверхность агаризованной среды требуемого состава в чашках Петри. Чашки инкубировались в термостате при 30° С. После этого фильтры с выросшими на них колониями переносили в новые чашки Петри на селективную среду (СС), лишенную аденина. В некоторых опытах непосредственно перед перенесением на СС или тотчас после этого каждую колонию (отдельно) растирали стеклянной палочкой для того, чтобы выяснить, содержится ли в ней микроколонии реверсов, состоящие из нескольких клеток; при наличии таких клеток на месте растертой первичной колонии вырастали две или больше колоний идентичных реверсов ("множественные" реверсы), тогда как отдельная клетка-реверс образует только одну колонию ("единичные" реверсы) <sup>14/1</sup>. Нерастертые или растертые колонии, перенесенные на СС, инкубировали при 30° С до 12 суток, ежедневно отмечая появившиеся колонии реверсов. К исходу 12 суток процесс выявления реверсов, как правило, завершался.

#### Выделение реверсов

Из каждой колонии реверсов вскоре после появления или в конце опыта петлей отбирали пробу, которую рассеивали истощающим штрихом на СС. Если в таком рассеве вырастали однородные колонии, их относили к истинным реверсам (что и было в подавляющем большинстве случаев) и использовали для дифференцировки на локусные и супрессорные.

#### Дифференцировка реверсов

Для дифференцировки реверсов на локусные (L) и супрессорные (S) использовали минимальную среду (МС) без аденина и лизина (МС1) и МС без аденина, но содержащую 30 мг/л лизина (МС2). Клетки каждого реверса суспендировали в воде, разлитой в лунки, откуда их переносили инокулятором на ПС, МС1 и МС2. Дифференцировку реверсов проводили в три этапа.

На первом этапе определяли окраску колоний реверсов. На больших выборках реверсов обоих штаммов было установлено, что как на ПС, так и на МС1 колонии реверсов четко различаются по окраске: некоторые колонии до конца культивирования сохраняют белый цвет, другие же на 4-5 сутки становятся в той или иной степени окрашенными, от бледно-розовых до красных и темно-вишневых.

На втором этапе, применимо только к штамму, ауксотрофному по аденину и лизину, используя среды МС1 и МС2, определяли прототрофность реверсов. На больших выборках было установлено, что практически все белые реверсы были прототрофными только по аденину и сохраняли потребность в ли-

зине, а окрашенные реверсы оказались прототрофными по обоим метаболитам. Резонно было допустить, что первые составляют группу из локусных реверсов, а вторые — из супрессорных.

На третьем этапе был проведен генетический анализ 37 случайно выбранных белых реверсов и 31 окрашенного, возникших из клеток штамма ДК769-172. Первые из них были прототрофами только по аденину, вторые — и по аденину, и по лизину. Генетический анализ этих реверсов проводился по методике, предложенной А.Б.Девиным и Н.А.Колтовой. Для этого клетки реверсов скрещивали с клетками тестерного штамма, чувствительного к циклогексимиду и прототрофного по аденину и ауксотрофного по лейцину. Перепечатывая бархатом клетки на СС без добавок аминокислот, отбирали колонии диплоидных клеток. Эти диплоидные клетки переносили на предспоруляционную, а затем на споруляционную среду. Проспорулировавшие клетки наносили истощающим штрихом на ПС с циклогексимином. В случае мутантного аденинового гена (ade2-792) на фоне белых колоний истощающего штриха видны красные колонии сегрегантов. В случае локусной реверсии красных сегрегантов не обнаруживается. В результате проведенного анализа установлено, что все 37 реверсов, образующих белые колонии, не выщепляли красных сегрегантов, а из 31 реверса, образующего окрашенные колонии, 29 выщепляли красные сегреганты, в двух случаях анализ выявил смесь клеток: клетки, не выщеплявшие, и клетки, выщеплявшие красные сегреганты. Можно предположить, что в этих двух случаях мы наблюдали на фоне первичной мутации локусного типа вторичную, изменившую окраску колоний. В целом генетический анализ показал хорошее согласие с дифференцировкой на локусные и супрессорные реверсы по окраске и ауксотрофности клеток.

Хорошая точность фенотипической дифференцировки реверсов для штамма ДК769-172 и очень хорошее соответствие белой окраски реверсов прототрофности только по аденину, а розовой — по аденину и лизину, как для штаммов ДК769-172, так и для штамма 769-p192-15B-p4, позволяет думать, что и у штамма p192 локусные реверсы образуют белые колонии, а супрессорные — окрашенные. Это заключение несколько расходится с результатами работ Т.А.Дутовой <sup>16/1</sup>, где было показано, что некоторые супрессорные реверсы дрожжей штамма p-192 могут образовывать колонии белого цвета. Различие это, скорее всего, обусловлено различиями в составе СС, использованных нами и Дутовой, что, как правило, влияет на окраску колоний адениновых мутантов дрожжей.

Учитывая все это, мы в своей работе достаточно надежным критерием локусной природы реверсов считали белую окраску образующихся колоний, а супрессорной природы — розовую. Если некоторые супрессорные реверсы и образуют неокрашенные или слабо окрашенные колонии <sup>16/1</sup>, это может приводить к некоторому завышению класса локусных реверсов и занижению класса супрессорных, что, однако, не влияет существенно на основные обнаруженные нами закономерности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Кривые выявления реверсов

На рис. 1 в качестве примера приведены две гистограммы выявления реверсов на СС у использованных нами штаммов после предварительного подрашивания на средах, содержащих разное количество аденина. Это — типичные двугорбинные кривые. На рис. 2 для этих же штаммов показана динамика

относительного содержания локусных реверсов ( $\frac{L}{L+S} \cdot 100\%$ ) среди всех,

выявившихся к данному сроку. Характерной особенностью здесь является постепенное увеличение, с течением времени, относительного содержания локусных реверсов. Такое изменение соотношения  $L/(L+S)$  имеет место для обоих штаммов и разных условий предварительного культивирования, сказывающихся только на скорости нарастания доли локусных реверсов. Следовательно, причины, обуславливающие динамику выявления реверсов, показанную на рис. 1 и 2, общие для разных штаммов и не зависят от внешних условий. Можно перечислить четыре такие причины: 1) разное селективное давление клеток исходного штамма на локусные и супрессорные реверсы, зависящее от усло-

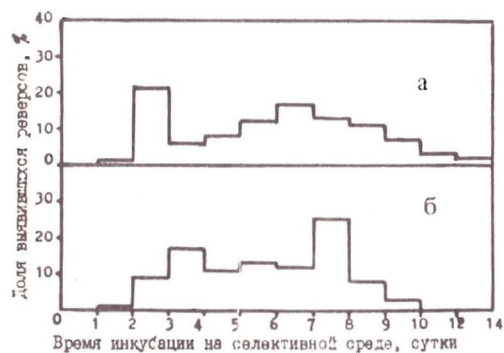


Рис. 1. Динамика выявления реверсов на селективной среде после выращивания ауксотрофных клеток на средах с аденином: а — штамм ДК769-172, 5 мг/л аденина (653 реверса); б — штамм р192, 100 мг/л аденина (122 реверса).

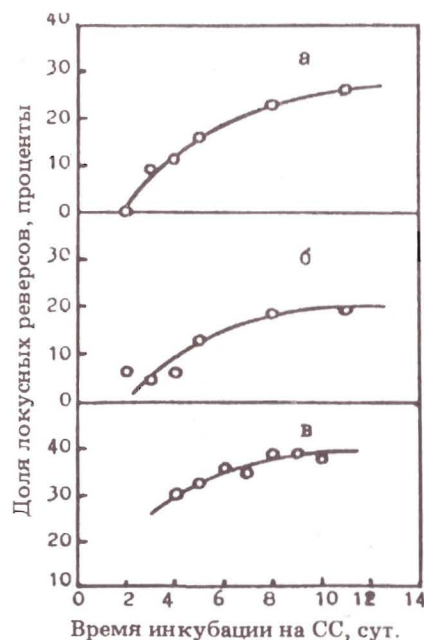


Рис. 2. Динамика относительного содержания локусных среди всех реверсов, выявившихся к данному сроку на селективной среде. Штамм ДК769-172, 5 мг/л аденина, 653 реверса (а); 500 мг/л аденина, 981 реверс (б); штамм р192, 1 мг/л аденина, 110 реверсов (в).

вий их предварительного культивирования; 2) разное расположение реверсов в исходных колониях и связанное с этим разное время, требующееся для образования из них вторичных колоний, видимых невооруженным глазом; 3) разная скорость размножения клеток независимо возникающих реверсов; 4) разные сроки возникновения разных реверсов и связанные с этим разные размеры ревертантных микроколоний к моменту переноса на СС. Попробуем выяснить, какой вклад вносит в этот процесс каждая из этих причин.

### Маркировка исходных колоний клетками реверсов

Для проверки, в какой мере селективный фактор может влиять на динамику выявления реверсов, на штамме р-192 были проведены следующие опыты. L- и S-реверсы, выделенные после предварительной инкубации клеток на среде с 10 мг/л аденина, добавляли в соотношении 1:200 к суспензиям ауксотрофных клеток р192, предварительно выращенных на средах с 10 и 100 мг/л аденина. Всего использовали по 20 локусных реверсов и по 20 супрессорных. Концентрацию клеток в суспензии подбирали так, чтобы при посеве инокулятором с 220 штырьками на каждый инокулюм приходилось в среднем примерно по 200 ауксотрофных клеток и по 1 клетке реверса. Из смешанной суспензии делали отпечатки на фильтры, наложенные на СС (контроль), и на среды с 10 мг/л аденина (для ауксотрофных клеток, выросших на этой среде) и с 100 мг/л аденина (для ауксотрофных клеток, выросших на этой среде). Чашки Петри со средой, содержащей аденин, инкубировали 5 суток, после чего фильтры с выросшими колониями переносили на СС и продолжали их инкубацию. Появляющиеся колонии реверсов учитывали ежедневно в течение 7 суток (на 5 сутки их выявление завершилось). Фон за счет спонтанно возникающих реверсов, по специально проведенной оценке, не превышал 3-5% от числа колоний, образующихся из клеток-маркеров, и не мог значительно исказить результаты.

Итоги этих экспериментов сведены в табл. 1. Сравнение с контролями показывает, что как на среде с 10 мг/л аденина, так и на среде с 100 мг/л аденина колонии образуют практически все клетки реверсов-маркеров. Мы видим также, что на среде с 10 мг/л аденина колонии реверсов выявляются быстрее, чем на среде с 100 мг/л аденина. И, наконец, видно, что на обеих средах L-реверсы появляются в более ранние сроки и более дружно, чем S-реверсы, что особенно заметно после их подрашивания на более богатой аденином среде.

Таким образом, модельная ситуация (с помощью вносимых в колонии ауксотрофных клеток реверсов) дает качественно такую же картину выявления реверсов, как на рис. 1, хотя и более сжатую во времени. Последнее вполне объяснимо — ведь клетки реверсов вносили в колонии при их засеве, так что к моменту переноса на СС они образовали микроколонии, содержащие примерно по  $10^2-10^3$  клеток. Между собой такие микроколонии различались только расположением среди окружающих их ауксотрофных клеток, что и обуславливало растянутость во времени (до 4-5 суток) образования ими видимых глазом колоний. Но так как различия в расположении в ауксотрофных колониях для L- и S-реверсов должны быть идентичными, более позднее вы-

Таблица 1

Динамика выявления локусных (L) и супрессорных (S) реверсов-маркеров на селективной среде после предварительного подрачивания в течение 5 суток в колониях ауксотрофных клеток на средах с 10 и 100 мг/л аденина. Штамм p192

Содержание аденина в МС		10 мг/л		100 мг/л					
Тип реверсов		L	S	L	S				
Число чашек Петри		5	8	6	8				
Общее число колоний		1105	1768	1326	1768				
Число колоний с реверсами		n	%	n	%	n	%	n	%
Срок инкубации на селективной среде (сутки)	1	382	96,2	561	87,2	271	69,1	3	0,7
	2	8	2,0	54	8,4	73	18,6	170	40,2
	3	1	0,3	9	1,4	30	7,7	152	35,9
	5	6	1,5	19	3,0	18	4,6	98	23,2
	7	0	0	0	0	0	0	0	0
Сумма		397	100	643	100	392	100	423	100
В среднем на одну чашку	Опыт	79,4±6,7		80,4±5,1		65,3±7,3		52,9±3,2	
	Контроль*	73,5±5,2		72,6±3,4		66,3±6,2		54,8±3,7	

\* Посев сразу на селективную среду.

явление S-реверсов по сравнению с L-реверсами, особенно заметное после выращивания на среде с 100 мг/л аденина, может быть обусловлено только различиями в скоростях формирования ими колоний. Как видно из табл. 1, колонии S-реверсов формируются медленнее, чем колонии L-реверсов, причем различие это возрастает с ростом числа окружающих их ауксотрофных клеток: число таких клеток в одной колонии на среде с 100 мг/л аденина равно примерно  $0,6 \times 10^7$ , а на среде с 10 мг/л аденина —  $10^6$ .

Маркировка исходных колоний реверсами, индуцированными облучением

Так как закономерности выявления внесенных в ауксотрофные колонии реверсов-маркеров могут отличаться от закономерностей выявления реверсов,

возникающих в таких колониях, мы использовали для их маркировки индукцию реверсов  $\gamma$ -квантами  $^{137}\text{Cs}$  (установка "Свет", мощность дозы 35 Гр/мин). Очевидно, что индуцированные облучением реверсы как L-, так и S-типа возникают одновременно, в самых разных местах исходных колоний, и различия в их выявлении, если таковые существуют, могут быть обусловлены только различиями самих реверсов.

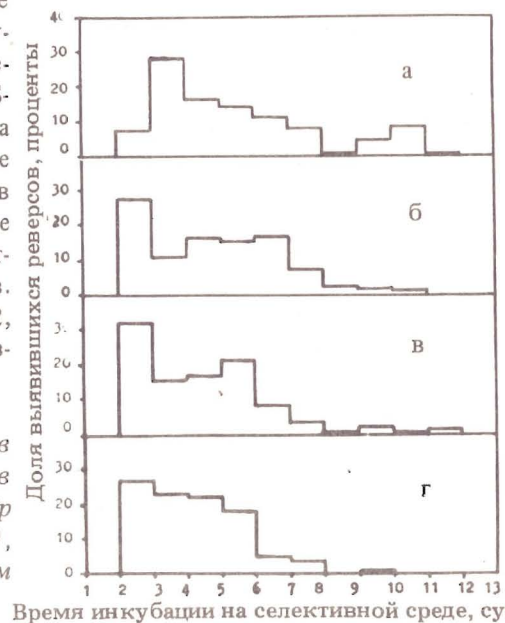
Мы использовали две методики: 1) клетки штамма p-192 высевали газон на ПС, там же облучали в разных дозах и тотчас же, при помощи репликатора, переносили на СС, где инкубировали до полного выявления реверсов; 2) клетки штамма p-192, выращенные газонем на ПС, переносили репликатором на СС, где их облучали и инкубировали далее до полного выявления реверсов.

При использовании первой методики мы определили динамику выявления индуцированных реверсов и кривые зависимости выхода L- и S-реверсов от дозы облучения.

Как показано на рис. 3, динамика выявления как спонтанно возникающих, так и индуцированных реверсов имеет сходный характер и подобна той, что изображена на рис. 1. Следовательно, результаты, полученные на спонтанных и индуцированных реверсах, вполне сопоставимы. На рис. 4а показано, что с увеличением дозы облучения выход реверсов увеличивается линейно с дозой, что справедливо для реверсов обоих типов. На рис. 4б показано, что соотношение L/(L+S) при облучении почти в 5 раз выше, чем в контроле, и не зависит от величины дозы.

В опыте, проведенном с помощью второй методики, перенесенные на СС ауксотрофные клетки облучали в дозе 140 Гр, а затем определяли динамику выявления L- и S-реверсов. Результаты приведены на рис. 5. Ясно видно, что при сходстве общей динамики выявления реверсов в контроле и после облучения обе эти группы существенно различаются по выявлению L- и S-реверсов. В контроле, в соответствии с рис. 2, выход L-реверсов со временем воз-

Рис. 3. Динамика выявления реверсов в контроле (а) и после облучения в дозах 70 Гр (б), 210 Гр (в) и 350 Гр (г). Общее число реверсов: 123 (а), 254 (б), 495 (в) и 546 (г). Штамм p192.



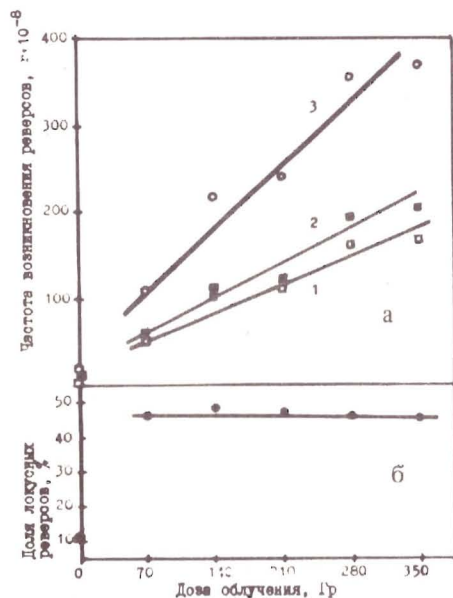


Рис. 4. Влияние облучения гамма-квантами на выход локусных и супрессорных реверсов: а – зависимость от дозы облучения выхода локусных (1) и супрессорных (2) реверсов и их суммы (3); б – то же для относительного выхода локусных реверсов. Штамм p192.

растает, тогда как после облучения в ранние сроки (1-3 сут) появляется больше колоний L-реверсов, чем в более поздние.

Различие это принципиально для понимания всего процесса выявления реверсов разных типов, и мы остановимся на нем подробнее. Динамика изменения соотношения L- и S-реверсов по времени, характерная для контроля (рис. 5а), может означать, что либо L-реверсы медленнее формируют колонии, чем S-реверсы, либо они образуются в более поздние сроки. Опыты с маркированием ауксотрофных колоний клетками реверсов позволили предположить, что это не так, а опыты с маркированием таких колоний облучением доказали, что на самом деле L-реверсы формируют колонии даже быстрее, чем S-реверсы (рис. 5б). Но в таком случае картина, характерная для контроля, должна означать либо то, что спонтанно возникшие L- и S-реверсы ведут себя в этом отношении противоположным образом, чем такие же реверсы, индуцированные облучением, либо то, что динамика выявления L- и S-реверсов в контроле искажается во време-

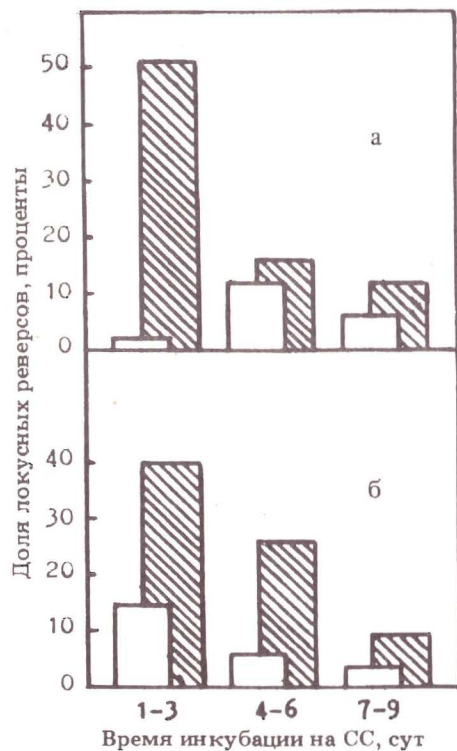


Рис. 5. Доля локусных (□) и супрессорных (■) реверсов, выявившихся за данный интервал времени на селективной среде, в контроле (а) и после облучения в дозе 140 Гр (б). Общее число реверсов (а – 236, б – 742) принимается за 100%. Штамм p192.

ни в результате дополнительного новообразования реверсов L-типа, что и деформирует кривую их выявления. Разграничивать эти две возможности можно следующим образом.

#### Эксперименты с растированием колоний на СС

Как уже отмечалось в "Методике", если колонии ауксотрофных клеток, выращенные на среде с лимитирующим метаболитом, до или сразу после перенесения на СС растереть стеклянной палочкой, это позволит отделить реверсы, возникающие заведомо до такого перенесения (они образуют класс "множественных" реверсов), от тех, которые возникают после перенесения, в ходе "остаточного роста" (класс "единичных" реверсов) <sup>1,2</sup>.

В нескольких опытах, выполненных по такой схеме, мы учитывали все L- и S-реверсы первой и второй групп. Результаты таких экспериментов приведены на рис. 6 и 7. Мы видим, что динамика выявления множественных и единичных реверсов существенно различается – первые выявляются быстрее, вторые – медленнее (рис. 7а и 7б). Различна и динамика относительного содержания L-реверсов: в группе множественных эта величина не зависит от продолжительности инкубации на СС, а в группе единичных соответствующая кривая имеет ярко выраженный максимум, и лишь после 3 суток снижается до уровня плато (рис. 6а и 6б). Суммарные кривые выявления множественных и единичных реверсов имеют сглаженные формы, маскирующие отмеченные выше особенности (рис. 6в и 7в).

Таким образом, можно считать окончательно доказанным, что L-реверсы всегда образуют колонии раньше, или во всяком случае не

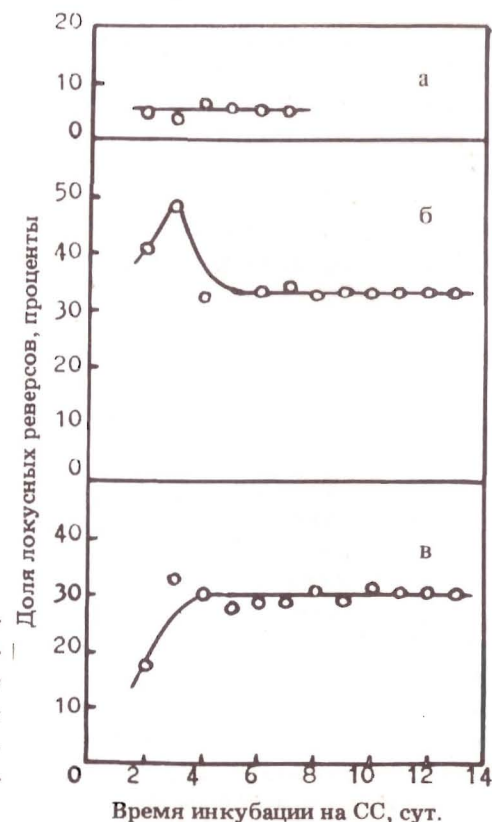


Рис. 6. Динамика относительного содержания локусных среди всех реверсов, выявившихся к данному сроку на селективной среде (штамм p192): а – множественные реверсы; б – единичные реверсы; в – сумма множественных и единичных.

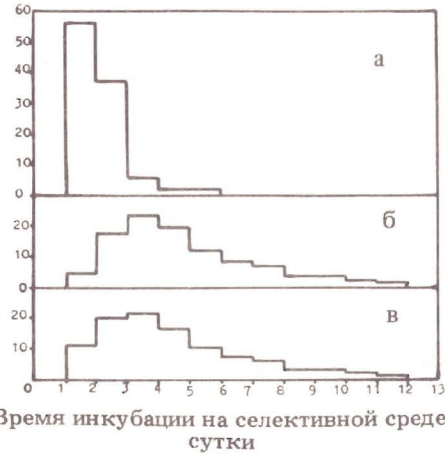


Рис. 7. Динамика выявления на селективной среде множественных (а) и единичных (б) реверсов и их суммы (в). Общее число реверсов: 214 (а), 1515 (б) и 1729 (в). Штамм р192. Предварительная инкубация на среде с аденином в течение 30 часов. (Данные для 1, 10 и 100 мг/л аденина объединены).

позже, чем одновременно с ними возникшие S-реверсы. Отмечавшиеся выше (рис. 2) отклонения от этой закономерности обусловлены лишь различиями в соотношениях L- и S-реверсов, образующихся в культуре

во время инкубации на среде с аденином и после перенесения на СС. Действительно, как мы видим на рис. 6, среди реверсов, образующихся в колонии ауксотрофных клеток до их перенесения на СС, относительное содержание L-реверсов невелико — около 6%, а среди реверсов, образовавшихся после, т.е. во время остаточного роста, эта величина повышается в среднем до 33%. Поэтому для правильного определения соотношения реверсов L- и S-типов необходимо сопоставить между собой реверсы, возникающие в одни и те же периоды развития культуры.

#### Проблема полноты выявления реверсов

Большая растянутость выявления на СС реверсов, возникших в колониях ауксотрофных клеток, позволяет думать, что полнота их выявления может находиться в обратной зависимости от размера исходных колоний, причем для разных групп реверсов это может быть выражено в разной степени. Частично этот вопрос уже рассматривался в работах<sup>1,2</sup>. Здесь мы посмотрим, как зависит полнота выявления L- и S-реверсов от размера колоний, выращенных на среде с одинаковым содержанием аденина, а затем перенесенных на СС.

В табл. 2 приводится материал, полученный в опыте, где определяли динамику выявления L- и S-реверсов в нерастертых и растертых колониях, перенесенных на СС после выращивания в течение 40 часов и 7 суток на среде со 100 мг/л аденина, но при разном количестве такой среды в чашках Петри — 10 и 30 мл. Во всех четырех группах заметно большое различие в числе колоний реверсов, выросших на нерастертых и растертых первичных колониях. Примем за 100% число реверсов, выявившихся на растертых колониях. Мы видим, что даже в группе "40 час, 10 мл среды", где в одной колонии содержалось всего около  $2,3 \times 10^6$  клеток, без растирания выявлялось лишь 26,4% реверсов. Процент выявления реверсов уменьшается с увеличением числа клеток в колонии, хотя во всех группах доля выявленных L-реверсов всегда больше, чем S-ревер-

Таблица 2  
Динамика выявления докучных (L) и супрессорных (S) реверсов на селективной среде в нерастертых и растертых колониях, выращенных в течение 40 часов и 7 суток в чашке Петри с 10 и 30 мл питательной среды, содержащей 100 мг/л аденина. Штамм р192

Возраст культуры	40 час						7 суток					
	10 мл		30 мл		10 мл		30 мл		10 мл		30 мл	
Объем среды	3388		3509		2360		2540		2360		2540	
Число колоний	3388		3509		2360		2540		2360		2540	
Число клеток в 1 колонии	$2,26 \times 10^6$		$4,34 \times 10^6$		$7,02 \times 10^6$		$2,21 \times 10^7$		$7,02 \times 10^6$		$2,21 \times 10^7$	
Группа	Не раст.		Растерт.		Не раст.		Растерт.		Не раст.		Растерт.	
Тип реверсов	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S
2	—	1	3	4	—	2	—	—	—	—	—	—
3	1	7	28	38	2	3	—	—	—	—	—	—
4	6	4	25	34	7	1	—	—	—	—	—	—
5	4	6	5	28	1	4	—	—	—	—	—	—
6	2	7	8	34	—	7	—	—	—	—	—	—
7	2	6	2	11	1	6	—	—	—	—	—	—
8	9	5	2	10	10	7	—	—	—	—	—	—
9	1	2	4	3	6	4	—	—	—	—	—	—
Сумма	25	38	79	160	27	32	96	117	11	124	90	112
% от "растерт."	31,6	23,8	100	100	28,1	27,4	100	100	12,2	100	100	100

сов. При максимальном размере колоний, равном  $2,2 \times 10^7$  клеток ("7 сут, 30 мл среды"), даже растирание оказывается недостаточно эффективным приемом: абсолютное число реверсов (в расчете на колонию) значительно меньше, чем в той же группе после 40 часов инкубации, что особенно ярко выражено для S-реверсов.

Как показал специальный опыт с колониями, выращенными на средах с 1 и 10 мг/л аденина, лишь при резком лимите по аденину (1 мг/л), когда размер колоний не превосходит  $5,9 \times 10^5$  клеток, в течение 12 суток инкубации на СС на нерастертых колониях выявляется до 95% локусных и 85% супрессорных реверсов. В группе 10 мг/л аденина ( $1,4 \times 10^6$  клеток на колонию) эта величина уменьшается до 30 и 4% соответственно, т.е. недовыявление опять значительно ярче выражено для супрессорных реверсов, чем для локусных.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при перенесении колоний ауксотрофных клеток, выросших на среде с лимитирующим метаболитом, на СС, этого метаболита не содержащей, процесс выявления предсуществующих реверсов может растянуться до 6-8 суток, причем L-реверсы появляются более дружно и в более сжатые сроки, чем S-реверсы. Учет тех и других обычно осложнен добавочным образованием на СС реверсов за счет остаточного роста, выявление которых может растягиваться до 12 суток и будет маскировать выявление предсуществовавших реверсов, так как и общий выход, и соотношение L- и S-реверсов в обеих группах может существенно различаться. Наиболее надежный метод оценки соотношения L- и S-реверсов, существующих в культуре до ее перенесения на СС, — это растирание свежеперенесенных колоний стеклянной палочкой и учет "множественных" реверсов.

Метод растирания имеет еще одно достоинство: с его помощью можно существенно повысить выявляемость предсуществовавших реверсов, иногда в десятки раз. Доля выявленных реверсов (а для L-реверсов она, как правило, больше, чем для S-реверсов, см. табл. 2) быстро убывает с увеличением числа клеток в первичной колонии свыше  $5 \times 10^5$ , особенно когда эти колонии выращивают при избытке лимитирующего метаболита.

Таким образом, динамику выявления реверсов на лимитированных средах определяют три основных фактора: относительная скорость размножения L- и S-реверсов (для L-реверсов она выше), расположение таких реверсов в первичной колонии (что влияет на дисперсию сроков выявления) и число клеток в первичной колонии (с увеличением числа клеток сверх  $10^6$  быстро уменьшается доля выявленных реверсов, особенно S-типа).

Наиболее корректной методикой оценки содержащихся в культуре реверсов разных типов, несмотря на ее трудоемкость, является методика растирания только что перенесенных колоний с полным учетом реверсов "множественного" класса.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ильина В.Л., Корогодина В.И. — *Генетика*, 1987, 23, №4, с.630.
2. Чепурной А.И., Михова-Ценова Н. Препринт ОИЯИ Р19-87-563, Дубна, 1987.
3. Ильина В.Л., Корогодина В.И., Файси Ч. — *Генетика*, 1987, 23, №4, с.637.
4. Корогодина В.И. и др. Препринт ОИЯИ Р19-88-351, Дубна, 1988; направлено в сб.: *Онтогенез, эволюция, биосфера. М.: Наука*.
5. Захаров И.А. и др. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л.: Наука, 1984.
6. Арман И.П., Дутова Т.А. — *Генетика*, 1978, 14, №2, с.2128.

Рукопись поступила в издательский отдел  
26 октября 1988 года.