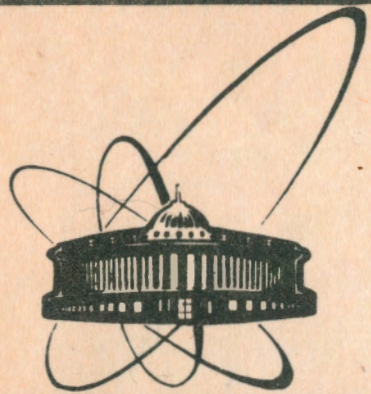


92-74



**СООБЩЕНИЯ
ОБЪЕДИНЕННОГО
ИНСТИТУТА
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА**

P19-92-74

В. Л. Корогодина, В. И. Корогодин, Е. С. Майорова

**ДИНАМИКА ВЫЯВЛЕНИЯ РЕВЕРТАНТОВ У ДРОЖЖЕЙ,
ИМЕЮЩИХ СЛАБЫЙ ОСТАТОЧНЫЙ РОСТ**

Динамика выявления ревертантов у дрожжей,
имеющих слабый остаточный рост

Анализ динамики выявления локусных и супрессорных ревертантов, возникающих у ауксотрофных по лейцину клеток дрожжей, показал зависимость полноты их выявления от размеров исходных колоний, что проявляется даже при их выращивании разное время на одних и тех же средах. Указанную зависимость удалось выявить, используя штамм со слабо выраженным остаточным ростом. Высказывается предположение, что разные сроки и полнота выявления ревертантов связаны, в основном, с разным характером синтеза лейцина, благодаря мутированию разных сайтов гена *leu2* и генов-супрессоров. Влияния содержания лейцина в питательной среде, от 0 до 300 мг/л, на частоту мутирования дрожжей данного штамма от leu^- к leu^+ не обнаружено.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1992

Перевод М.И.Потапова

Korogodina V.L., Korogodin V.I., Maiorova E.S.

P19-92-74

Dynamics of Revealing Revertants of Yeast
with Weak Residual Growth

Analysis of dynamics of revealing locus and suppressor revertants of leucine-auxotrophic yeast cells showed that fullness of their revealing depends on the size of initial colonies, which manifests itself even when they are grown for different time in the same media. This dependence was revealed by using a strain with weak residual growth. It is assumed that different revertant revealing time and fullness are mainly caused by different character of leucine synthesis due to mutation of different sites of the *leu2* gene and suppressor genes. The leucine content of the nutrient medium (from 0 to 300 mg/l) was not found to affect the mutation frequency of yeast of the given strain from leu^- to leu^+ .

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

Введение

Ранее отмечалось, что у дрожжевых клеток при разных условиях культивирования гены могут мутировать с разными частотами ^{/1/}. Один из приемов, использованных для разделения мутантов, возникающих на разных средах, был следующий. Колонии дрожжей, ауксотрофных по какому-либо метаболиту, выращивали на микропористых фильтрах ^{/2/} при наличии в среде этого метаболита, затем тщательно растирали стеклянной палочкой (каждую колонию отдельно) и переносили (вместе с фильтрами) на среду, не содержащую этот метаболит. На второй селективной среде размножение исходных клеток прекращалось, а из мутантов, не нуждавшихся в отсутствующем метаболите, образовывались колонии вторичного роста. На растертых колониях, состоящих из исходных клеток, вырастали колонии мутантов двух типов: "множественные", состоящие из двух или более вторичных колоний (образованных клетками мутанта, успевшего до растирания поделиться один или несколько раз), и "единичные" (возникшие из мутантов, не успевших поделиться до растирания или образовавшихся уже после растирания, во время остаточного роста ауксотрофных клеток на селективной среде) ^{/3/}.

Для разделения мутантов, возникающих до и после перенесения клеток с одной среды на другую, этот критерий достаточно надежен лишь в случае штаммов, обладающих хорошим остаточным ростом на второй среде. Так было, например, при работе с дрожжами, ауксотрофными по аденину ^{/4/}. Однако в общем случае, когда в число единичных мутантов неизбежно попадают и те, которые возникают еще на исходной среде, но до растирания не успевают ни разу поделиться, это будет приводить к ошибкам в учете мутантов, возникающих на разных средах. Ясно, что ошибки эти будут тем более выражены, чем меньше остаточный рост. Настоящая работа и посвящена анализу динамики выявления множественных и единичных ревертантов у штамма со слабым остаточным ростом, характеризующегося отсутствием спонтанного мутагенеза без репликации ^{/5/}.

Материал и методика

Штамм гаплоидных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* НАЗ-24А (а leu2-1 lys1-1) получен от А.И.Чепурного (ОИЯИ) ^{15/}. Ревертанты к прототрофности по лейцину возникают либо за счет "обратных" мутаций в гене leu2 ("локусные" ревертанты), либо за счет мутаций в генах-супрессорах ("супрессорные" ревертанты).

Среды использовали полные и минимальные ^{16/}. К минимальным средам в разных опытах добавляли лейцин в концентрациях 3, 30 или 300 мг/л, а также лизин в концентрации 30 мг/л. Среда без лейцина была селективной.

Культивирование. Дрожжи выращивали на полной среде в течение 48 час. при 30° (сплошной посев в чашку Петри). Из выросших клеток готовили суспензию, а затем с помощью штампа для упорядоченного посева ^{17/} клетки переносили на микропористые фильтры, покрывающие питательный агар с разным содержанием лейцина (10²-10³ и более клеток на инокулум). Обычно в чашку наливали по 30 мл (для среды с 3 мг/л лейцина) или по 15 мл (для сред с 30 или 300 мг/л лейцина) такой среды. После инкубации на этих средах определяли число клеток в колониях (урожайность), а фильтры с колониями переносили на селективную среду по 30 мл/на чашку.

Инкубация на селективной среде. Выросшие на среде с лейцином колонии инкубировали на селективной среде либо в нерастертом состоянии (контроль), либо после растирания стеклянной палочкой (опыт). Инкубация продолжалась 21-23 суток, вплоть до прекращения появления новых колоний ревертантов на колониях исходных клеток.

Учет ревертантов. Появление ревертантов на селективной среде регистрировалось через сутки и продолжалось в течение трех недель. На дне чашек Петри разными значками ежедневно отмечали все появляющиеся ревертанты, в том числе те, которые по каким-либо причинам трудно было разделить на множественные и единичные; число последних было невелико, около 10%, и их, как правило, в дальнейшем не учитывали.

Дифференциация ревертантов. Появившиеся на селективной среде ревертанты разделяли на множественные и единичные и подвергали фенотипическому анализу по потребности в метаболитах. Для этого их переносили на следующие среды: 1) минимальная среда с лизином без лейцина; 2) минимальная среда с лейцином без лизина; 3) минимальная среда без лейцина и лизина. Локусными (L) считали ревертанты, растущие только на первой среде, а супрессорными (S) - на всех трех средах. Клоны, не растущие на средах без лейцина, из дальнейшего учета исключали.

Статистика. Для каждой группы в опытах использовали в среднем по 20 чашек Петри, в каждой из которых было по 220 колоний. Результаты учета возникающих ревертантов нормировали на 20 чашек Петри; эти данные и приводятся ниже. Частоту ревертирования R рассчитывали двумя способами: 1) в тех вариантах, где учитывали число колоний, не содержащих ревертантов, - по формуле $R = \frac{1}{n} \ln \frac{N}{N_0}$, где n - число клеток в одной колонии, а N и N₀ - число всех колоний и число колоний, не содержащих ревертантов; 2) в тех вариантах, где учитывали все выявившиеся ревертанты, - по формуле $R = \frac{r}{n \cdot N}$, где r - число всех ревертантов, а цифры в знаменателе означают среднее число клеток в колонии (n) и число учтенных колоний (N).

Результаты

Кривые роста дрожжей на средах с разным содержанием лейцина приведены на рис. I. Как показано в таблице I, голодание по лейцину (3 мг/л) сказывается как на скорости роста, так и на M-концентрации, тогда как избыток лейцина (300 мг/л) несколько ускоряет рост, но уменьшает M-концентрацию по сравнению с его стандартным содержанием (30 мг/л). Эти данные позволяют рассчитывать продолжительность инкубации, соответствующую нахождению клеток в логарифмической и стационарной фазах роста на средах разного состава.

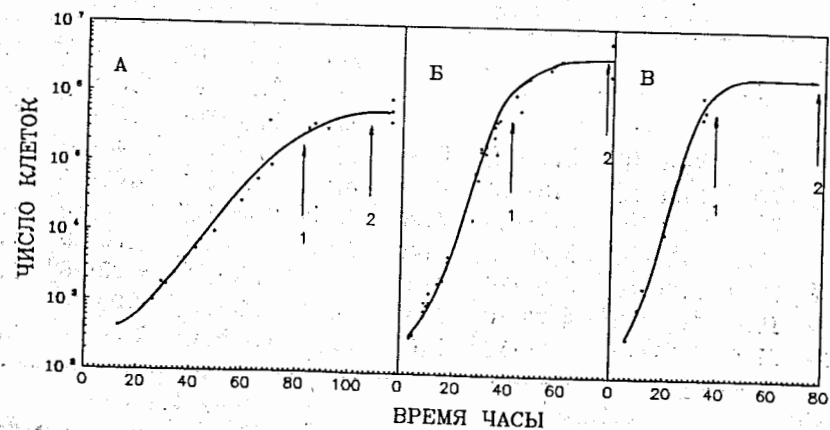


Рис. I. Кривые роста дрожжей НАЗ-24А на средах, содержащих 3 (А), 30 (Б) и 300 (В) мг/л лейцина. Результаты 4-х опытов.

Таблица 1. Время удвоения (час) и максимальная концентрация клеток в колонии при культивировании дрожжей на средах с разным содержанием лейцина (мг/л). По данным рис.1

Среда	Время удвоения	M-концентрация
3	7,2	$6,3 \cdot 10^5$
30	3,0	$3,7 \cdot 10^6$
300	2,6	$2,2 \cdot 10^6$

Остаточный рост специально определяли на протяжении двух лет в семи опытах после ранних сроков выращивания клеток на среде с 3 мг/л лейцина и в десяти опытах - с 30 мг/л лейцина (см. табл.2).

Таблица 2. Остаточный рост дрожжей при инкубации в течение разного времени (t, сут.) на селективной среде после предварительного выращивания на разных средах. Число клеток в одной колонии

№	3 мг/л			30 мг/л				
	t	Исходное число, кл./кол.	Конечное число, кл./кол.	KOP*	Исходное число, кл./кол.	Конечное число, кл./кол.	KOP	
1	-	-	-	-	1,1	$7,70 \cdot 10^4$	$9,90 \cdot 10^4$	1,29
2	-	-	-	-	1,1	$1,20 \cdot 10^5$	$1,85 \cdot 10^5$	1,54
3	-	-	-	-	1,3	$1,20 \cdot 10^5$	$1,45 \cdot 10^5$	1,21
4	0,8	$9,20 \cdot 10^4$	$5,50 \cdot 10^4$	0,60	1,3	$7,70 \cdot 10^4$	$8,40 \cdot 10^4$	1,14
5	7,0	$2,28 \cdot 10^5$	$1,87 \cdot 10^5$	0,82	8,0	$4,73 \cdot 10^5$	$6,50 \cdot 10^5$	1,37
6	7,0	$5,46 \cdot 10^5$	$6,54 \cdot 10^5$	1,20	12,0	$7,47 \cdot 10^4$	$1,00 \cdot 10^5$	1,34
7	11,0	$2,00 \cdot 10^5$	$2,80 \cdot 10^5$	1,40	13,0	$1,90 \cdot 10^5$	$2,60 \cdot 10^5$	1,37
8	13,0	$1,90 \cdot 10^5$	$2,50 \cdot 10^5$	1,32	13,0	$5,75 \cdot 10^5$	$9,90 \cdot 10^5$	1,72
9	15,0	$4,01 \cdot 10^5$	$6,73 \cdot 10^5$	1,68	18,0	$5,30 \cdot 10^5$	$9,20 \cdot 10^5$	1,74
10	21,0	$2,71 \cdot 10^5$	$2,75 \cdot 10^5$	1,02	21,0	$1,60 \cdot 10^5$	$2,00 \cdot 10^5$	1,25
KOP		$1,15 \pm 0,13$				$1,40 \pm 0,06$		

* KOP - коэффициент остаточного роста; равен частному от деления конечного числа клеток в колонии на исходное число.

Несмотря на колебания коэффициента остаточного роста (KOP) от опыта к опыту, что скорее всего отражает вариации урожайности в параллельных чашках Петри, картина здесь ясная. В условиях наших экспериментов, независимо от продолжительности инкубации на исходной и селективной средах, величина KOP в первом случае была равна $1,15 \pm 0,13$, а во втором - $1,40 \pm 0,06$. В пределах ошибки опытов эти величины не различаются (p = 0,1) и их можно объединить. Суммарная величина KOP равна $1,29 \pm 0,07$, что соответствует приросту около 30% клеток от исходного их числа. Величина KOP не зависит ни от среды предварительного культивирования, ни от продолжительности последующего пребывания клеток на селективной среде. Скорее всего, остаточный рост завершается в течение первых суток.

Опыты с нерастертыми колониями. В этих опытах ревертанты не разделяли на множественные и единичные, а только дифференцировали на локусные и супрессорные. Как показано на рис.2, процесс выявления

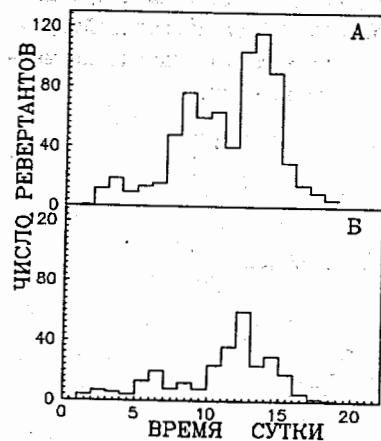


Рис.2. Динамика выявления локусных (А) и супрессорных (В) ревертантов на селективной среде в опыте с нерастертыми колониями. Среда культивирования - 3 мг/л лейцина, конец логарифмической фазы роста (возраст культуры 48 час).

ревертантов после выращивания клеток на среде с 3 мг/л лейцина (конец логарифмической фазы) продолжается около 20 суток, причем динамика выявления для L- и S-ревертантов различается. В этом опыте колонии, перенесенные на селективную среду, содержали по $3 \cdot 10^5$ клеток, и всего было зарегистрировано 720 и 282 L- и S-ревертантов, что соответствует частотам их возникновения, равным $6,3 \cdot 10^{-7}$ (для L-ревертантов) и $2,3 \cdot 10^{-7}$ (для S-ревертантов).

Опыты с растертыми колониями. Динамика выявления L- и S-ревертантов в культурах, перенесенных на селективную среду после выращивания на средах с тремя концентрациями лейцина, для логарифмической фазы роста показана на рис.3, а для стационарной - на рис.4. Для сопоставления с рис.2 здесь приведены объединенные данные для множественных и единичных ревертантов. Обращает на себя внимание два обстоятельства. Во-первых, независимо от содержания лейцина в исход-

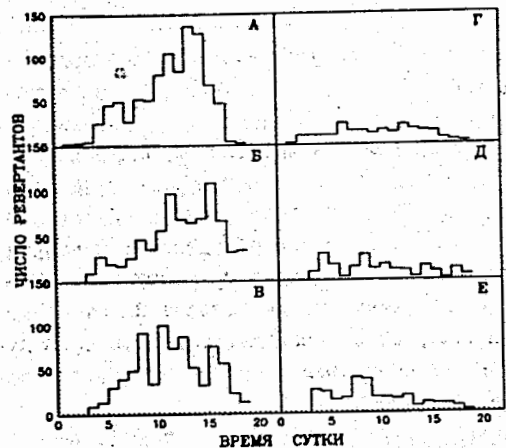


Рис.3. Динамика выявления ревертантов на селективной среде в опыте с растертыми колониями. Перенос со среды культивирования на селективную в логарифмической фазе роста. Среда культивирования: 3 мг/л (А,Г), 30 мг/л (Б,Д) и 300 мг/л (В,Е) лейцина. Локусные (А,Б,В) и супрессорные (Г,Д,Е) ревертанты. Данные по множественным и единичным ревертантам объединены.

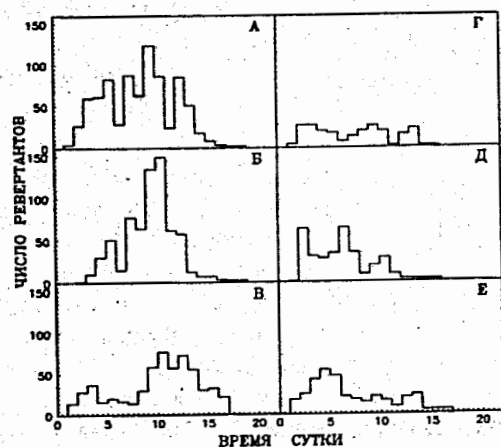


Рис.4. Динамика выявления ревертантов на селективной среде в опыте с растертыми колониями. Перенос со среды культивирования на селективную в стационарной фазе роста. Среда культивирования: 3 мг/л лейцина (А,Г), 30 мг/л (Б,Д) и 300 мг/л (В,Е) лейцина. Локусные (А,Б,В) и супрессорные (Г,Д,Е) ревертанты. Данные по множественным и единичным ревертантам объединены.

ной среде и размера колоний (см. табл.3), процесс выявления ревертантов продолжается одно и то же время – около 20 суток. Во-вторых, динамика выявления примерно одинакова для нерастертых и растертых колоний для 3 мг/л лейцина, но различается для сред с разным исходным содержанием лейцина. Эти различия есть и в случае культур, находящихся в разных фазах роста (рис.3 и 4).

Таблица 3. Характеристики культур, использованных в эксперименте. Среда – содержание лейцина, мг/л

Среда	Логарифмическая фаза			Стационарная фаза		
	t*	Клеток в колонии · 10 ⁵		t*	Клеток в колонии · 10 ⁵	
		При переносе	Через 20 суток		При переносе	Через 20 суток
3	54	3,3±0,6	3,3±0,5	96	5,0±0,9	5,5±0,7
30	22	9,7±2,1	10,3±0,8	96	22,9±7,1	21,7±3,2
300	22	13,0±2,1	11,2±2,2	96	21,1±6,7	14,2±3,3

* – возраст культуры (час). Расхождения с рис.1 в числе клеток на колонию при данном возрасте культуры объясняется большим числом клеток на инокулюм при засевах.

Выявление множественных и единичных локусных ревертантов показано на рис.5 и 6 – для логарифмической и стационарной фазы роста. Хорошо видно, во-первых, что продолжительность выявления примерно одинакова для всех вариантов опытов; во-вторых, что спектры выявления для множественных и единичных ревертантов различаются между собой; в-третьих, что спектры эти различаются и для культур, перенесенных на селективную среду в разных фазах роста.

Частоты и абсолютные числа возникающих ревертантов для всех вариантов опытов приведены в таблице 4. Мы видим, что максимальные значения эти частоты имеют для группы 3 мг/л и логарифмической фазы роста (54 час). С увеличением содержания лейцина в среде и сроков инкубации значения частот уменьшаются. Характерно при этом, что при переходе от логарифмической (54 и 22 час) к стационарной (96 час) фазе почти при всех исходных концентрациях лейцина наблюдается уменьшение абсолютного числа всех ревертантов. Это хорошо выражено для единичных локусных ревертантов, а для множественных супрессорных имеет место обратная картина. Однако во всех случаях увеличение числа клеток в исходных колониях сопровождается уменьшением числа регистрируемых ревертантов и, как следствие этого, – уменьшением рассчитанной частоты мутирования.

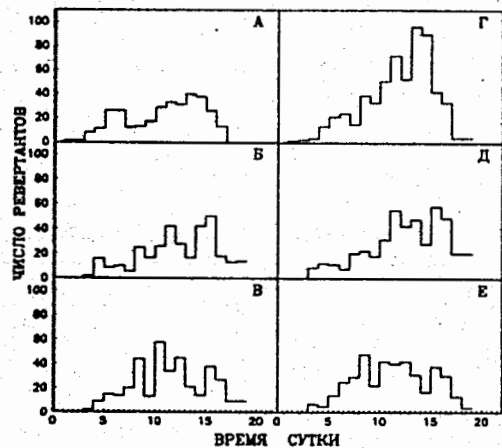


Рис.5. Динамика выявления локусных ревертантов на селективной среде в опыте с растертыми колониями. Перенос со среды культивирования на селективную в логарифмической фазе роста. Среды культивирования: 3 мг/л (А,Г), 30 мг/л (Б,Д) и 300 мг/л (В,Е) лейцина. Множественные (А,Б,В) и единичные (Г,Д,Е) ревертанты.

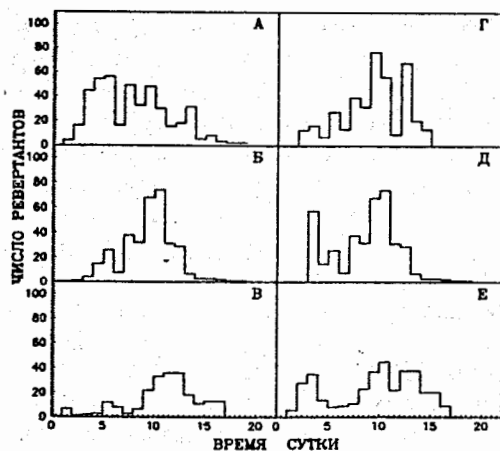


Рис.6. Динамика выявления локусных ревертантов на селективной среде в опыте с растертыми колониями. Перенос со среды культивирования на селективную в стационарной фазе роста. Среды культивирования: 3 мг/л (А,Г), 30 мг/л (Б,Д) и 300 мг/л (В,Е) лейцина. Множественные (А,Б,В) и единичные (Г,Д,Е) ревертанты.

Таблица 4. Частота и абсолютное количество ревертантов, образующихся на средах с разным содержанием лейцина (мг/л)

Среда	Фаза роста (возраст культуры)	Клеток в кол.	Ревертанты*		Частота $\cdot 10^{-8}$	Число ревертантов		
			Тип	Вид		Учтено	Ожидается**	Доля выявленных
3	Логарифм. (54 час)	$3,3 \cdot 10^5$	Мн	Л	22,5	325	325	1,00
				С	5,9	86	86	1,00
			Ед	Л	41,0	596	596	1,00
	Стационар. (96 час)	$5,5 \cdot 10^5$	Мн	Л	18,2	440	545	0,81
				С	4,1	99	143	0,69
			Ед	Л	16,0	382	992	0,39
30	Логарифм. (22 час)	$9,7 \cdot 10^5$	Мн	Л	8,3	356	960	0,37
				С	1,4	60	253	0,24
			Ед	Л	11,1	472	1750	0,27
	Стационар. (96 час)	$2,3 \cdot 10^6$	Мн	Л	3,4	342	2272	0,15
				С	2,1	210	599	0,35
			Ед	Л	3,9	392	4153	0,09
300	Логарифм. (22 час)	$1,3 \cdot 10^6$	Мн	Л	6,8	387	1284	0,30
				С	1,9	107	339	0,32
			Ед	Л	7,3	416	2347	0,18
	Стационар. (96 час)	$2,1 \cdot 10^6$	Мн	Л	2,5	231	2074	0,11
				С	1,4	126	547	0,23
			Ед	Л	4,2	385	3793	0,10
			С	2,5	229	872	0,26	

* Мн - множественные, Ед - единичные, Л - локусные, С - супрессорные ревертанты.

** При постоянстве частот возникновения локусных и супрессорных ревертантов во всех группах, равных таковому в первой группе.

Обсуждение

Прежде всего обратим внимание на динамику выявления множественных и единичных локусных ревертантов на селективной среде (рис.5 и 6). Процесс выявления начинается через сутки после перенесения исходных колоний на селективную среду и завершается спустя примерно двадцать суток, независимо от состава исходной среды, возраста культуры и типа ревертантов. Это означает, что после перенесения на селективную среду ревертанты практически не образуются – такие ревертанты дали бы смещение динамики единичных ревертантов по сравнению с динамикой множественных вправо (см. /3/), чего в общем случае нет. Этот факт хорошо согласуется со слабым остаточным ростом (табл.2 и 3) на селективной среде у данного штамма. Значит, в нашем случае подавляющее большинство единичных ревертантов образуется при тех же условиях культивирования, что и множественные, только из тех клеток, которые к моменту перенесения на селективную среду еще не успели поделиться.

Синхронность появления в наших опытах на селективной среде множественных и единичных ревертантов хорошо отражена кривыми накопленных частот (рис.7). Здесь видна следующая закономерность: с увеличе-

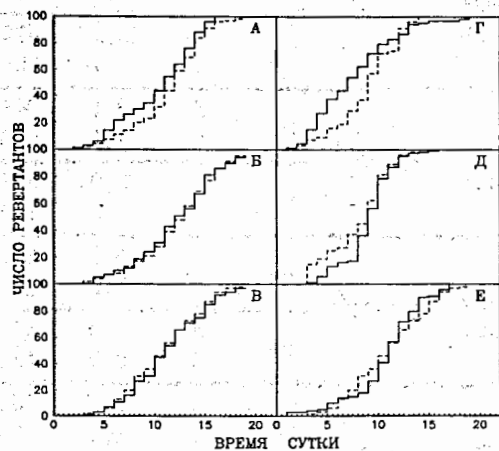


Рис.7. Динамика выявления локусных ревертантов на селективной среде в опыте с растертыми колониями. Кривые накопленных частот. Сплошная линия – множественные ревертанты, пунктирная – единичные. Среды культивирования: 3 мг/л (А,Г), 300 мг/л (Б,Д), 300 мг/л (В,Е). Перенос со среды культивирования на селективную в логарифмической (А,Б,В) и в стационарной (Г,Д,Е) фазах роста. За 100% принято общее количество множественных или единичных локусных реверсов (цифры см. в табл.4).

нием числа клеток в исходных колониях (см. табл.4) множественные ревертанты выявляются все более медленно по сравнению с единичными. С переходом от 3 к 300 мг/л лейцина более быстрое выявление множественных ревертантов сменяется более быстрым выявлением единичных, что особенно заметно для стационарной фазы роста. При 30 мг/л лейцина кривые накопленных частот для обеих групп ревертантов занимают промежуточное положение.

Чтобы понять эту закономерность, рассмотрим значения частот и абсолютных чисел ревертантов, выявляющихся после выращивания разное время на разных средах. Из таблицы 4 следует, что суммарные частоты выявления всех (локусных и супрессорных, множественных и единичных) ревертантов убывают с увеличением содержания лейцина в среде. Этому могут быть две причины: уменьшение частот мутирования генов с увеличением содержания метаболита в среде (как в случае штаммов, дефектных по гену *ade2*, см. /1,3,4/), а также уменьшение выявляемости ревертантов с увеличением размеров исходных колоний /8/. Наши данные лучше соответствуют второй причине. Действительно, из таблицы 4 следует, что частота мутирования на всех трех средах уменьшается при переходе от логарифмической к стационарной фазе роста, что сопровождается уменьшением абсолютного числа выявленных ревертантов. Особенно это заметно для локусных ревертантов: для всех сред в логарифмической фазе зарегистрировано 2552, а в стационарной – 2172 ревертанта (разница статистически достоверна $p < 0,01$). Это означает, что выход ревертантов уменьшается не столько с увеличением содержания лейцина в среде, сколько с увеличением размеров колоний исходных клеток, даже когда это происходит при переходе от логарифмической к стационарной фазе роста на одной и той же среде, т.е. при ее истощении по лимитирующему метаболиту (особенно в случае 3 и 30 мг/л лейцина).

Это обстоятельство, хорошо выраженное уже для среды с 3 мг/л лейцина, позволяет утверждать, что указанные выше различия в частотах ревертирования в разных группах – результат уменьшения выявления уже возникших ревертантов с увеличением числа клеток в исходной колонии. Это наблюдается независимо от того, растирали или нет колонии перед их перенесением на селективную среду, о чем свидетельствует сопоставление частот выявления ревертантов у нерастертых и растертых колоний: $(8,6 \pm 1,1) \cdot 10^{-7}$ и $(7,9 \pm 1,3) \cdot 10^{-7}$ соответственно при 3 мг/л лейцина, а также $(4,9 \pm 0,8) \cdot 10^{-7}$ и $(4,3 \pm 0,7) \cdot 10^{-7}$ при 30 мг/л лейцина. На рис.8 показана зависимость выявленных ревертантов (в долях от их ожидаемого числа) от количества клеток в одной колонии; за 1,0 принято число локусных и, отдельно, супрессорных ревертантов при 3 мг/л лейцина в логарифмической фазе роста. Видно, что монотонное убывание этой вели-

чины определяется только размером колоний, а не другими факторами. Видно также, что уменьшение выхода ревертантов с увеличением размеров колоний для супрессорных ревертантов идет несколько медленнее, чем для локусных.

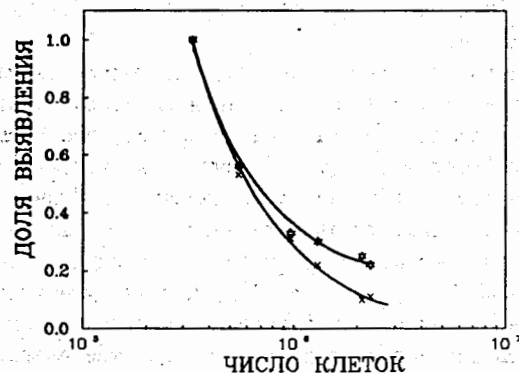


Рис. 8. Зависимость полноты выявления ревертантов от числа клеток в исходной колонии: кресты — локусные, звездочки — супрессорные ревертанты.

Все это позволяет думать, что в случае ауксотрофности по лейцину, по крайней мере для штамма НАЗ-24 А, содержание лейцина в среде, на которой выращивают исходные клетки, определяя размеры колоний, значительно сильнее влияет на выявление ревертантов, нежели на частоту их образования. Это означает, что при разных исходных содержаниях лейцина от 3 до 300 мг/л, ревертанты возникают с частотой порядка $7,9 \cdot 10^{-7}$ (как при 3 мг/л), а различия в зарегистрированных частотах на разных средах — результат их недовыведения. Это соображение и позволило нам рассчитать ожидаемые числа ревертантов, возникающих при разных условиях, и его расхождение с регистрируемыми числами, т.е. данные, приведенные в двух последних столбцах таблицы 4 и на рис. 8.

Еще раз сопоставим кривые накопленных частот для выявления ревертантов, возникающих в разных условиях (рис. 7). Заметим, что эти кривые отражают поведение локусных ревертантов, которых образуется в несколько раз больше, чем супрессорных (табл. 4). Естественно, что при 3 мг/л лейцина доминирование множественных ревертантов в течение первых 4-5 суток выявления отражает лишь одно обстоятельство — более быстрое выявление тех, которые представлены большим числом колоний; это — чисто статистическая причина, имеющая место как в случае логарифми-

ческой, так и, особенно, в стационарной фазе роста. Столь же простая причина, по-видимому, лежит в основе несколько более быстрого выявления единичных ревертантов по сравнению с множественными для культур с 300 мг/л лейцина; достаточно допустить, что невыявленными чаще оказываются ревертанты, проявляющиеся при 3 мг/л лейцина в более поздние сроки. При этом допущении естественно ожидать, что с уменьшением числа выявляемых ревертантов более быстро и полно будут выявляться те, которые образуют колонии в более ранние сроки, причем, этот эффект будет ярче выражен у единичных ревертантов, чем у множественных (феномен также чисто статистический). При 30 мг/л лейцина картина выявления будет иметь промежуточный характер, что мы и наблюдали.

Теперь попробуем описать общую картину выявления на селективной среде ревертантов по гену *leu2*.

Процесс выявления, начинающийся сразу после перенесения на селективную среду культур, выращивавшихся разное время (от 22 до 96 час) на средах с разным содержанием лейцина (от 3 до 300 мг/л), продолжается около трех недель. Скорее всего, причина этого — различия в особенностях синтеза лейцина у разных ревертантов. Размеры колоний исходных клеток, по-видимому, не играют здесь существенной роли. Во всяком случае, мы не обнаружили замедления выявления с увеличением этих размеров. Связь сроков выявления ревертантов с характером синтеза лейцина хорошо иллюстрируется различиями в динамике выявления локусных и супрессорных ревертантов (рис. 3 и 4): супрессорные ревертанты примерно равномерно выявляются в течение всего срока, а основная масса локусных ревертантов выявляется во второй половине этого срока (за исключением среды с 300 мг/л лейцина, где выявляется всего около 10% всех ревертантов, см. табл. 4).

Нам не удалось выявить ревертанты, образующиеся после перенесения культур на селективную среду, во время остаточного роста. По-видимому, их возникает так мало, что при выявлении они сливаются с теми, которые возникли в более ранний период. Резкого повышения частоты мутирования на селективной среде, что было зарегистрировано нами для гена *ade2* $1,3,4$, в данном случае не обнаружено.

С увеличением числа клеток в исходных колониях все большая доля возникших ревертантов не выявляется на селективной среде. Этот "эффект невыявления" — скорее всего, следствие конкуренции исходных клеток и клеток-ревертантов за общие источники питания, что не только уменьшает регистрируемую частоту ревертирования на исходной среде, но и характерно деформирует динамику выявления реверсов, что особенно заметно при сравнении реверсов локусных и супрессорных (см. рис. 2-4). Таким образом, при изучении зависимости частот мутирования от условий

культивирования путем учета колоний ревертантов на селективных средах необходимо учитывать как динамику их выявления (растягивающуюся иногда до трех недель), так и феномен недоявления, или неполного выявления, зависящий от размеров колоний исходных клеток.

Литература

1. Korogodin V.I., Korogodina V.L., Fajszai Cs. Mutability of Genes Depends on Their Functional State - a Hypothesis.//Biol. Zent., 1990, v.109, p.447-451.
2. Флеров Г.Н. Синтез сверхтяжелых элементов и применение методов ядерной физики в смежных областях. - Вестник АН СССР № 4, 1984, с.35-48.
3. Корогодина В.И., Абетян Н.О., Брунцкова Х., Джанполадян Н.Л., Корогодина В.Л., Михова-Ценова Н., Симомян Н.В., Файси Ч., Чепурной А.И. Спонтанный мутагенез и условия культивирования клеток. - В кн.: "Онтогенез, эволюция, биосфера", М. Наука, 1989, с.60-70.
4. Korogodin V.I., Korogodina V.L., Fajszai Cs., Chepurnoy A.I., Mikhova-Tsenova N., Simonyan N.V. On the Dependence of Spontaneous Mutation Rates on the Functional State of Genes.//Yeast., 1991, v.7, p.105-117.
5. Чепурной А.И., Михова-Ценова Н., Брунцкова Х. Спонтанное мутирование *leu2* у *Saccharomices Cerevisiae*.//Генетика, 1989, т.25, с.1952-1959.
6. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.Н., Федорова И.В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л., Наука, 1984.
7. Хромов-Борисов Н.Н. Метод упорядоченного посева для исследования мутационного процесса у микроорганизмов. - В кн.: Конференция по генетике промышленных микроорганизмов, Цахкадзор. Тез. докл. М., Наука, 1973, с.35.
8. Чепурной А.И., Михова-Ценова Н. Закономерности выявления мутантов на селективных средах.//Генетика, 1988, т.24, с.1572-1578.

Рукопись поступила в издательский отдел
26 февраля 1992 года.