

Б. Ф. ЯРОВОЙ

ЦИТОДУКЦИЯ ФАКТОРА УСТОЙЧИВОСТИ К ЭРИТРОМИЦИНУ У ДРОЖЖЕЙ

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 10 VII 1972)

Показано, что у дрожжей с низкой, а иногда и с высокой частотой осуществляется особая форма полового объединения клеток, при которой диплоидная зигота вообще не образуется, а потомству передается цитоплазма обоих родителей и ядерный материал лишь одного. Это явление, в некоторых отношениях аналогичное андрогенезу у высших организмов, было названо цитодукцией⁽¹⁾. В качестве цитоплазматического маркера в первоначальных опытах использовалась мутация фактора синтеза дыхательных ферментов ρ . Гаплоидные цитодуктанты, т. е. потомки, возникшие при такой форме полового объединения клеток, совмещали ρ -фактор одного родителя и ядерные маркеры другого. Очевидно, цитодукция дает легко осуществляемый тест на цитоплазматическую детерминацию того или иного признака.

В данной работе при изучении цитодукции был использован мутант, устойчивый к эритромицину, у которого предварительно обычным генетическим анализом было установлено цитоплазматическое наследование этого признака. Аналогичные мутации устойчивости у дрожжей описаны в литературе⁽²⁾.

Материалом для выделения мутанта, устойчивого к эритромицину E^R , послужил гаплоид 6ПГ-3 (генотип $[\rho^+] \alpha ad_1$), чувствительный к эритромицину E^S . При этом была использована полная среда⁽³⁾, где глюкоза заменена на этиловый спирт (1%) с эритромицином (2 мг/мл). Селективной средой для отбора цитодуктантов служила минимальная среда с глюкозой (0,1 г/л), аденином (5 мг/л) и этиловым спиртом (2%), а для определения генотипа цитодуктантов эта же среда, но без аденина. Чашки инкубировали в термостате при 30°.

Спонтанно возникшие мутантные клоны, выросшие на среде с эритромицином, были устойчивы к данному антибиотику. Полученных мутантов скрещивали с гаплоидами противоположного типа спаривания, как $[\rho] \alpha ad_2$, так и $[\rho^-] \alpha ad_2$. Генетический анализ гибридов проводили путем изучения случайной выборки спор. Массовое выделение аскоспор осуществляли при помощи пищеварительного сока улиток⁽⁴⁾. Результаты генетического анализа гибридов и данные об устойчивости гибридов к эритромицину будут описаны в другом сообщении. В настоящей работе был использован цитоплазматический мутант № 7 (генотип $[\rho^+ E^R] \alpha ad_1$) и выделенный из него возникший в результате спонтанного процесса мутирования штамм генотипа $[\rho^- E^R] \alpha ad_1$.

Так как методика выявления цитодукции у дрожжей основана на совместном посеве на плотную селективную среду клеток двух гаплоидных штаммов, один из которых несет мутацию в цитоплазме $[\rho^-]$ и поэтому не способен к росту на этой среде, а другой — любую ядерную мутацию, для которой данная среда будет также селективной, то потребовалось введение в генотип мутанта № 7 нового ядерного маркера his_{10} — мутации потребности в гистидине. Для этого был получен диплоид генотипа $[\rho^+ E^R / E^S] \alpha / \alpha ad_1 / ad_1 his_{10} / his_{10}^+$ и из него выделены два устойчивых

к эритромицину гаплоида следующих генотипов: $[\rho^+E^R]a\text{his}_{10}$ и $[\rho^+E^R]a\text{ad}_1\text{his}_{10}$. В качестве партнера для скрещивания с этими гаплоидами был использован гаплоид генотипа $[\rho^-E^0]\alpha\text{ad}_2$. Обозначения цитоплазматических маркеров взяты из работы (5). Предполагалось, что на селективной среде будут расти нормально образующиеся зиготы, дающие белые колонии, колонии с красными секторами, т. е. возникшие из зигот, которые дали гаплоидные почки, рекомбинантные по ядерным и цитоплазматическим маркерам и цитодуктанты генотипа $[\rho^+E^R]\alpha\text{ad}_2$, дающие цельные красные колонии.

В проведенных опытах действительно были получены все три типа колоний. Частота цитодукции (отношение числа цитодуктантов к сумме чисел цитодуктантов и диплоидных зигот) в обоих скрещиваниях была 0,3%. Из скрещивания $[\rho^-E^0]\alpha\text{ad}_2 \times [\rho^+E^R]a\text{his}_{10}$ было выделено 66 цитодуктантов, а из скрещивания $[\rho^-E^0]\alpha\text{ad}_2 \times [\rho^+E^R]a\text{ad}_1\text{his}_{10}$ 36 цитодуктантов. Все цитодуктанты скрестились только с тестером генотипа $[\rho^-]a\text{ad}_1$, образовав белый диплоид, способный к росту на минимальной среде, а также выросли на среде с эритромицином. Таким образом, генотип всех цитодуктантов оказался, как и ожидалось, $[\rho^+E^R]\alpha\text{ad}_2$.

Полученные результаты демонстрируют цитодукцию еще одного цитоплазматического фактора — фактора устойчивости к эритромицину и, таким образом, подтверждают существование автономного переноса цитоплазматических наследственных факторов при скрещивании клеток дрожжей противоположного типа спаривания. Одновременная во всех случаях передача маркеров селектируемого ρ^+ и неселектируемого E^R , т. е. отсутствие их сегрегации, дает новое доказательство физического сцепления этих цитоплазматических маркеров.

Иные результаты были получены, когда фактор E^R передавался потомству со стороны ρ^- родителя. Донорами цитоплазмы при скрещивании с гаплоидом $[\rho^-E^R]\alpha\text{ad}_1$ были штаммы $[\rho^+E^R]a\text{his}_{10}$ и $[\rho^+E^S]a\text{alc}_4$ (alc_4 — мутация дыхательной недостаточности).

В первом варианте скрещивания, с участием родителя, меченного маркером his_{10} , на чувствительность к эритромицину были проверены 22 красных цитодуктанта, а также 204 белых диплоидных клона, выросшие из зигот. Среди цитодуктантов 18 клонов оказались устойчивыми к эритромицину и 4 — чувствительными, а среди зигот 182 устойчивых и 22 чувствительных. Колонии, устойчивые к данному антибиотику, клонировались, а клоны опять высевались на среду с эритромицином. 67% проанализированных диплоидных колоний по этому признаку не проявили сегрегации, а 33% были смешанные, т. е. такие зиготы дают начало как чувствительным, так и устойчивым диплоидам (что было отмечено и другими авторами) (6). При проверке клонов из устойчивых гаплоидных цитодуктантов было также обнаружено, что 80% гаплоидов оказались стабильными по признаку устойчивости, а остальные 20% состояли из смеси клеток, различавшихся по этому признаку.

При скрещивании того же мутанта $[\rho^-E^R]$ с партнером, меченым маркером alc_4 , было проанализировано 85 цитодуктантов и 100 диплоидов. Среди диплоидов было обнаружено 88 устойчивых и 12 чувствительных к эритромицину колоний, а среди цитодуктантов 66 устойчивых и 19 чувствительных. При аналогичном анализе методом клонирования в этом варианте скрещивания выявлено только 10% диплоидов, сохраняющих стабильно признак устойчивости, и в то же время среди гаплоидных цитодуктантов процент несегрегирующих по этому признаку гаплоидов достигает 60%.

Из приведенных данных видно, что на стабильность передачи признака устойчивости к эритромицину в потомстве от скрещиваний может влиять генотип одного из родителей, в данном случае генотип партнера, являющегося донором цитоплазмы $[\rho^+E^S]$. Наличие несегрегирующих по признаку эритромицин-устойчивости гибридных диплоидов и гаплоидных цитодук-

тантов в обоих вариантах опыта дает основание предполагать, что такие рекомбинантные фенотипы [ρ^+E^R] появляются не в результате простого смешивания различных цитоплазматических факторов в цитоплазме, а являются следствием процессов, аналогичных рекомбинационным процессам в хромосомах и происходящих при первом делении зиготы.

Ленинградский институт ядерной физики
Академии наук СССР

Поступило
4 VII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. А. Захаров, Л. В. Юрченко, Б. Ф. Яровой, Генетика, № 9, 136 (1969).
² A. W. Linnane, G. W. Saunders et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **59**, № 3, 903 (1968). ³ И. А. Захаров, Б. В. Симаров, Генетика, № 3, 118 (1966).
⁴ И. А. Захаров, С. Г. Инге-Вечтомов, Исследования по генетике, **2**, 134 (1964). ⁵ D. Coen, J. Deutsch et al., Control of Organelle Development, Cambr. Univ., № 24, 449 (1970). ⁶ E. B. Gingold, G. W. Saunders, et al., Genetics, **62**, № 4, 735 (1969).